

Karlova Univerzita v Praze

Přírodovědecká fakulta

Antropologie a genetika člověka



Bc. Markéta Ondráčková

**Detekce extracelulárních mikroRNA v mateřské cirkulaci – diagnostika a
prognostika těhotenských komplikací**

**Detection of extracellular microRNAs in maternal circulation – diagnosis and
prognosis of pregnancy related complications**

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Ilona Hromadníková, Ph.D.

Praha 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání stejného nebo jiného akademického titulu.

V Praze dne 14. 8. 2013

Podpis

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala své školitelce Prof. RNDr. Iloně Hromadníkové, Ph.D. za cenné připomínky a odborné vedení práce. Dále bych chtěla poděkovat všem kolegyním z laboratoře, které se podílely na prvotním zpracování biologického materiálu. Zvláštní poděkování patří Mgr. Kateřině Kotlabové za rady a spolupráci v experimentální části práce.

Výzkum byl prováděn na Univerzitě Karlově v Praze, na 3. lékařské fakultě. Financován byl z grantů GA ČR 304/12/1352 a PRVOUK P32.

Abstrakt

MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující RNA o délce 18 až 25 nukleotidů, které posttranskripčně regulují genovou expresi. Exprese některých miRNA je tkáňově specifická. Vycházela jsem z předpokladu, že těhotenské komplikace související s placentární insuficiencí by mohly být charakterizovány unikátním profilem placentárně specifických miRNA v mateřské cirkulaci.

Koncentraci a genovou expresi vybraných extracelulárních miRNA (miR-516-5p, miR-517*, miR-518b, miR-520a*, miR-520h, miR-525, miR-526a) jsem měřila v plazmě pacientek s preeklampsií (PE), fetální růstovou retardací (FGR) a gestační hypertenzí (GH). Kontrolní skupinu tvořily pacientky s fyziologickým průběhem gravidity (FG). Celkem jsem zpracovala 168 vzorků plazmy, zastoupení jednotlivých diagnóz bylo následující: PE 63, FGR 27, GH 23, FG 55. Detekce a kvantifikace probíhala metodou kvantitativní PCR v reálném čase. Identifikovala jsem tři miRNA, které se u pacientek s PE nacházely ve zvýšených hladinách. Jednalo se o miR-517*, miR-520a* a miR-525. Závažnost onemocnění, která byla charakterizována formou onemocnění (mírná nebo závažná PE) a termínem porodu (před nebo po 34. týdnu gravidity), neměla na hladiny miRNA statisticky významný vliv. U více než čtvrtiny pacientek se jednalo o PE superponovanou na předchozí hypertenzi, předchozí výskyt hypertenze neměl vliv na koncentraci ani genovou expresi vybraných miRNA. U pacientek s FGR a GH se hladiny miRNA nelišily od pacientek s fyziologickým průběhem těhotenství.

Dále jsem našla slabou negativní korelaci mezi parametry z ultrazvukového vyšetření krevního oběhu plodu (tzv. dopplerovská flowmetrie) a hladinami miRNA v krevním oběhu matky. Závažnější nález z ultrazvuku doprovázela vyšší genová exprese placentárně specifických miRNA.

Výsledky práce naznačují, že miR-517*, miR520a* a miR-525 by se mohly uplatňovat v patogenezi PE.

Klíčová slova: Extracelulární mikroRNA, preeklampsie, fetální růstová retardace, gestační hypertenze, kvantitativní PCR v reálném čase

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs of length 18 to 25 nucleotides that regulate gene expression posttranscriptionally. Expression of some miRNAs is tissue specific. I assumed that pregnancy induced complications associated with placental insufficiency could be characterized by a unique profil of placental-specific miRNAs in maternal circulation.

I measured concentration and gene expression of selected miRNAs (miR-516-5p, miR-517*, miR-518b, miR-520a*, miR-520h, miR-525 and miR-526a) in the plasma of patients with preeclampsia (PE), fetal growth restriction (FGR) and gestational hypertension (GH). The control group consisted of patients with a normal course of pregnancy (FG). I processed 168 plasma samples, the representation of individual diagnosis were as follows: PE 63, FGR 27, GH 23, FG 55. Detection and quantification was carried out by quantitative real-time PCR. I identified three miRNAs with elevated levels in a group of preeclamptic patients: miR-517*, miR-520a* and miR-525. The severity of the PE, which was characterized by a form of the disease (mild or severe PE) and term (before or after the 34th week of pregnancy), did not have a statistically significant effect on the levels of miRNAs. More than a quarter of patients had PE superimposed on previous hypertension. Previous history of hypertension had no effect on the concentration or gene expression of selected miRNAs. Levels of miRNAs did not differ in patients with GH and FGR from patients with a normal course of pregnancy.

I also found weak negative correlation between the parameters of the ultrasound examination of fetal circulation (the so-called Doppler velocimetry) and miRNA levels in the maternal circulation. Major finding of ultrasound was accompanied by increased gene expression of placental-specific miRNA.

Results of the study suggest that miR-517*, miR-520a* and miR-525 could be applied in the pathogenesis of preeclampsia.

Key words: Extracellular microRNA, preeclampsia, fetal growth restriction, gestational hypertension, quantitative real-time PCR

Obsah

Seznam zkratk	7
1. Úvod	8
2. MikroRNA	10
2.1 Historie	10
2.2 Nomenklatura	10
2.3 Lokalizace mikroRNA v genomu	11
2.4 Biogeneze	12
2.4.1 Transkripce	12
2.4.2 Maturace	13
2.5 Regulace genové exprese.....	14
2.6 Kritéria pro zařazení mezi mikroRNA	16
2.7 Stabilita a transport extracelulárních mikroRNA	16
2.8 Detekce mikroRNA a metody normalizace dat	18
2.8.1 Kvantitativní PCR v reálném čase	18
2.8.2 Normalizace dat	20
2.9 MikroRNA jako biomarkery.....	21
3. MikroRNA v těhotenství	23
3.1 Expres mikroRNA v placentě	23
3.1.1 Expres mikroRNA v placentě pacientek s těhotenskými komplikacemi	24
3.2 MikroRNA v mateřské cirkulaci	27
3.3 Extracelulární mikroRNA a těhotenské komplikace	28
4. Těhotenské komplikace	31
4.1 Hypertenze v těhotenství	31
4.2 Preeklampsie.....	31
4.2.1 Diagnostika a dělení preeklampsie	32
4.2.2 Patogeneze preeklampsie	33
4.2.3 Mechanismy preeklampsie.....	34
4.2.4 Dědičnost a kandidátní geny	37
4.3 Fetální růstová retardace.....	38
4.3.1 Konstitučně malí novorozenci / plody (SGA)	38
4.3.2 Intrauterinní růstová retardace (IUGR).....	39
4.4 Dopplerovská flowmetrie v diagnostice těhotenských komplikací	41
5. Vybrané miRNA pro studium těhotenských komplikací	43

6. Cíle práce.....	44
7. Materiál	45
8. Metody	50
8.1 Zpracování biologického materiálu	50
8.2 Izolace RNA obohacené o krátké RNA z krevní plazmy	50
8.3 Izolace RNA obohacené o krátké RNA z placentární tkáně.....	51
8.4 Měření koncentrace extrahované RNA na spektrofotometru	51
8.5 Reverzní transkripce	52
8.6 Kvantitativní PCR v reálném čase	52
8.7 Kvantifikace extracelulárních miRNA v mateřské cirkulaci.....	53
8.7.1 Absolutní kvantifikace	53
8.7.2 Relativní kvantifikace	54
8.8 Statistická analýza	54
9. Výsledky	56
9.1 Koncentrace a genová exprese extracelulárních mikroRNA u pacientek s těhotenskými komplikacemi	56
9.2 Koncentrace a genová exprese extracelulárních mikroRNA u pacientek s těhotenskými komplikacemi – rozdělení podle diagnóz	61
9.3 Koncentrace a genová exprese extracelulárních mikroRNA ve vztahu k závažnosti preeklampsie	66
9.4 Koncentrace a genová exprese extracelulárních mikroRNA u pacientek s preeklampií vzhledem k předchozímu výskytu hypertenze.....	67
9.5 Vztah dopplerovských parametrů a koncentrace nebo genové exprese extracelulárních miRNA u pacientek s těhotenskými komplikacemi	67
9.5.1. Vztah mezi hladinami extracelulárních miRNA a pulzatilním indexem v <i>arteria umbilicalis</i>	68
9.5.2 Vztah mezi hladinami extracelulárních miRNA a pulzatilním indexem v <i>arteria cerebri media</i>	69
9.5.3 Vztah mezi hladinami extracelulárních miRNA a cerebroplacentárním indexem ...	74
10. Diskuze.....	78
11. Závěr.....	82
Literatura	84
Příloha 1: Tabulky.....	94

Seznam zkratek

5' cap	methyloguanosinová čepička na 5'konci mRNA
ACOG	Americké kolegium gynekologie a porodnictví (American College of Obstetrics and Gynecology)
Ago2	protein Argonaut2
AT1	receptor typu 1 pro angiotenzin
C14MC	klastr genů na chromozomu 14
C19MC	klastr genů na chromozomu 19
CPI	cerebroplacentární index
Ct	prahová hodnota (threshold cycle)
DGCR8	protein DiGeorge syndrome critical region 8
EH	esenciální hypertenze
eIF4E	eukaryotní iniciační faktor 4E
Exp-5	protein Exportin 5
FGR	fetální růstová retardace
GDM	gestační diabetes mellitus
GH	gestační hypertenze
HELLP	syndrom s příznaky hemolýzy, zvýšeného množství jaterních enzymů v krvi a sníženým množstvím krevních destiček (H emolysis, E levated L iver enzymes, L ow P latelets)
HIF	(hypoxia inducible factor)
HLA	komplex genů lidských leukocytárních antigenů
IUGR	intrauterinní růstová retardace
KIR	receptor na NK buňkách podobný imunoglobulinu (killer-cell immunoglobulin-like receptor)
LBW	nízká porodní hmotnost
miRNA	mikroRNA
PAPPA	(pregnancy associated plasma protein A)
PE	preeklampsie
PI	pulzatilní index
PIGF	placentární růstový faktor
qRT-PCR	kvantitativní PCR v reálném čase
RISC	(RNA induced silencing komplex)
SGA	konstitučně malý novorozenec / plod (small to gestational age)
TGF-β	transformující růstový faktor β
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR1 (Flt1)	receptor pro vaskulární endoteliální faktor typu 1 (fms-related tyrosine kinase 1)
VEGFR2 (Flk1)	receptor pro vaskulární endoteliální faktor typu 2 (fetal liver kinase 1)
WHO	Světová zdravotnická organizace

1. Úvod

Diagnostické metody používané v těhotenství se dělí na metody invazivní a neinvazivní. Díky pokrokům v molekulární biologii a novým poznatkům se možnosti neinvazivní prenatalní diagnostiky značně rozšířily. Jedním z klíčových momentů byl objev fetální DNA v krvi matky (Lo *et al.*, 1997). V současné době lze z krve matky určit pohlaví plodu, které je důležité zejména pro další postup u X-vázaných dědičných chorob (Costa *et al.*, 2002). Dále je možné provést genotypizaci Rh faktoru plodu (Lo *et al.*, 1998) nebo prokázat u plodu přítomnost mutace specifické pro β -thalasémii (Chiu *et al.*, 2002). Pozdější objev placentární mRNA v mateřské cirkulaci přinesl možnost sledovat neinvazivně expresi genů v placentě a nabízí tak možnost diagnostiky onemocnění, které souvisí například s placentární insuficiencí (Ng *et al.*, 2003). V posledních letech byla v periferní krvi matky odhalena přítomnost dalšího typu ribonukleové kyseliny – mikroRNA (Chim *et al.*, 2008).

MikroRNA (miRNA) jsou krátké molekuly o délce 18 až 25 nukleotidů, které se nacházejí uvnitř buněk i v extracelulárním prostředí. Prostřednictvím vazby na mRNA jsou schopny posttranskripčně regulovat genovou expresi. Množství a typ jednotlivých miRNA se v různých tkáních liší. V roce 2007 byla provedena rozsáhlá studie 345 lidských miRNA ve 40 tkáních. Výsledky ukázaly, že existují jak miRNA s expresí omezenou na určitý buněčný typ nebo tkáň, tak i miRNA, které jsou exprimovány ve všech tělních buňkách. Zároveň byla identifikována skupina více než 100 miRNA, jejichž exprese je specifická pro placentární tkáň. Velká část z nich je kódována na 14. a 19. chromosomu (Liang *et al.*, 2007). Hladiny miRNA se v krevní plazmě matky v průběhu těhotenství mění a jejich složení se liší od netěhotných žen. Rovněž platí, že množství některých miRNA po ukončení těhotenství rapidně klesá (Chim *et al.*, 2008; Kotlabová *et al.*, 2011).

Otázkou prozatím zůstává, jakou roli hrají v organismu extracelulární miRNA. Dříve převažovaly názory, že nukleové kyseliny se v extracelulárním prostředí nacházejí zejména jako buněčný odpad v podobě apoptotických tělísek (Lo *et al.*, 1997). Dnes je zřejmé, že se také účastní mezibuněčné komunikace. Transport probíhá prostřednictvím exosomů, které mají schopnost splynout s cílovou buňkou a ovlivnit její funkce. MiRNA nesené v exosomech proto mohou ovlivnit expresi genů i ve vzdálených mateřských buňkách (Valadi *et al.*, 2007).

Hladiny placentárně specifických miRNA v mateřské cirkulaci odrážejí aktuální stav placenty a mohly by být využity pro účely neinvazivní prenatalní diagnostiky u chorob způsobených například placentární insuficiencí. Mezi tato onemocnění patří preeklampsie nebo fetální růstová retardace.

Ve své práci jsem porovnávala koncentrace a genovou expresi sedmi extracelulárních placentárně specifických miRNA u žen s těhotenskými komplikacemi typu preeklampsie, gestační hypertenze a fetální růstové retardace v době klinické manifestace onemocnění. Zároveň jsem provedla analýzu stejných miRNA v průběhu celého těhotenství u pacientek s fyziologickým průběhem gravidity a u pacientek v prvním trimestru, u kterých se později objevila některá z výše uvedených komplikací (v době odběru biologického materiálu byly tyto pacientky bez příznaků). Jelikož neexistuje spolehlivá predikční metoda pro pozdější výskyt uvedených těhotenských komplikací, výsledky naší studie by se mohly stát podkladem pro identifikaci časných biomarkerů daných onemocnění.

2. MikroRNA

2.1 Historie

První molekula mikroRNA (miRNA) byla objevena v roce 1993 u *Caenorhabditis elegans*. Získala označení *lin-4* podle stejnojmenného genu. V buňce byly nalezeny jeho dva transkripty, první z nich byla RNA o délce 22 nukleotidů, druhá byla také molekula RNA o délce 61 nukleotidů. Obě molekuly obsahují sekvenci, která je komplementární k sekvenci v 3' nepřekládané oblasti (3'UTR) mRNA pro jiný gen - konkrétně gen *lin-14*. Protein LIN-14 se v buňkách *C. elegans* nachází zcela běžně, avšak při správném vývoji dochází během prvního larválního stadia k výraznému poklesu jeho množství. Přitom transkripce probíhá stále stejně intenzivně. Množství proteinu je regulováno posttranskripčně pomocí molekuly *lin-4*, která nasedá do 3'UTR mRNA a brání procesu translace (Lee *et al.*, 1993). O sedm let později byla u *C. elegans* objevena další krátká regulační molekula RNA – *let-7* o délce 21 nukleotidů. Tato RNA negativně reguluje geny *lin-14*, *lin-28*, *lin-41*, *lin-42* a *daf-12*. Mechanismus fungování je stejný jako u *lin-4*, molekula *let-7* je komplementární k sekvenci v 3'UTR mRNA cílových genů. Správná funkce *let-7* je nezbytná pro přechod jedince z larválního stadia do stadia dospělého jedince (Reinhart *et al.*, 2000).

Jelikož jsou obě molekuly úzce spjaty s kontrolou a načasováním správného vývoje a jejich přítomnost v buňce je časově omezená, používalo se označení stRNAs (small temporal RNAs). Během následujících měsíců byly objeveny další krátké regulační molekuly RNA u různých organismů včetně 21 molekul izolovaných z lidských HeLa buněk (Lagos-Quintana *et al.*, 2001). Název miRNA se začal používat od roku 2001 po vzájemné dohodě tří nejvýznamnějších vědeckých týmů v oboru (Lim P. Lee, Nelson C. Lau a Mariana Lagos-Quintana se svými kolegy).

2.2 Nomenklatura

MiRNA jsou pojmenovávány podle několika základních pravidel. Název se skládá z předpony „miR“ a jedinečného čísla – např. miR-16. V případě, že se nejedná o maturovanou miRNA, ale o její prekurzor, používají se u předpony malá písmena – např. mir-16. Gen kódující danou miRNA nese stejné označení, odlišení je pouze grafické (u živočichů použití kurzívy, u rostlin velká písmena bez pomlčky). Čísla jsou přiřazována

postupně, platí tedy, že miRNA s nižším číslem byla objevena dříve. Pokud je objevena miRNA se stejnou nebo velmi podobnou sekvencí u více organismů, má vždy stejné číselné označení. K označení druhové příslušnosti slouží další předpona, kterou tvoří počáteční písmena latinského názvu organismu – hsa-miR-16 pro *Homo sapiens*, cel-miR-39 pro *Caenorhabditis elegans* apod.

Pokud je jedna miRNA kódována na více místech v genomu, přidává se za číslo pomlčka s dalším číslem – např. hsa-miR-121-1 a hsa-miR-121-2. Dále se v názvech miRNA hned za číselnou kombinací používají malá písmena. Označují molekuly, jejichž sekvence se liší pouze minimálně – v jednom až dvou nukleotidech, např. hsa-miR-526a a hsa-miR-526b (Lagos-Quintana *et al.*, 2001). V buňce se někdy vyskytují dvě molekuly miRNA z jednoho prekurzoru, každá z nich se nachází na jiném raménku původní vlásky. Odtud vzniklo označení -3p a -5p (dříve také sense-s a antisense-as), např. hsa-miR-516-3p a hsa-miR-516-5p. Pokud se v buňce nachází výrazně vyšší množství produktu z jednoho raménka, nepoužívají se přípony -3p a -5p. Dominantní miRNA zůstává označena pouze číslem (případně číslem s písmenem), méně exprimovaná miRNA z druhého raménka získává za své označení hvězdičku, např. hsa-miR-520a a hsa-miR-520a* (Ambros *et al.*, 2003).

Výjimkou z těchto pravidel jsou miRNA lin-4 a let-7, u nichž se z historických důvodů používá originální název (Griffiths *et al.*, 2005)

2.3 Lokalizace mikroRNA v genomu

Geny pro miRNA se v genomu člověka vyskytují samostatně i ve shluku (tzv. klastr). U člověka bylo nalezeno 104 klastrů s geny pro miRNA (Yuan *et al.*, 2009). Klinicky významný je klastr miR-15-16 na chromosomu 13q14, který je často deletován u pacientů s chronickou lymfoidní leukemií. Delece genů u nemocných osob ukazuje na tumorsupresorový účinek celého klastru (Calin *et al.*, 2002). Podle lokality výskytu (vzhledem ke známým genům) lze geny pro miRNA rozdělit do tří hlavních skupin:

A) **Intergenové** – vyskytují se v oblastech vzdálených od známých genů; mohou být monocistronní = každá miRNA funguje jako samostatná transkripční jednotka s vlastním promotorem nebo polycistronní = několik miRNA je kódováno těsně za sebou a přepisovány i regulovány jsou jako jedna společná transkripční jednotka.

B) **Intronové** – nacházejí se v oblastech intronů známých genů (kódujících i nekódujících). Také v tomto případě se může v rámci jednoho intronu vyskytovat více genů pro miRNA, které jsou přepisovány jako klastr. Speciálním případem jsou tzv. mirtrony, kde se gen pro miRNA nachází mezi dvěma exony se sestřihovými místy na okrajích exonů, svou strukturou připomíná pre-miRNA (Ruby *et al.*, 2007). V případě mirtronů je zcela vynechán první krok biogeneze, tj. vznik a sestřih primární miRNA a proteiny mikroprocesoru (Drosha a DGCR8) se neuplatňují (Okamura *et al.*, 2007). Pro všechny intronové geny platí, že jsou přepisovány společně s hostujícími geny a nemají vlastní promotory.

C) **Exonové** – nejvzácnější ze všech tří možností, obvykle začínají v oblasti exonu hostujícího genu a částečně překrývají také intron. Hostujícím genem jsou dlouhé nekódující transkripty připomínající mRNA (mlncRNAs = mRNA-like noncoding RNAs). Také tyto miRNA nemají svůj vlastní regulační aparát a jsou přepisovány společně s hostujícími geny (Rodriguez *et al.*, 2004).

V posledních letech se ukazuje, že regulace prostřednictvím miRNA je mnohem komplexnějším dějem, než se původně myslelo. MiRNA z jednoho klastru často patří do různých rodin a regulují svou vazbou různé mRNA. Zároveň platí, že proteiny účastníci se společně jedné biologické dráhy jsou typicky regulovány miRNA ze stejného polycistronního klastru (Yuan *et al.*, 2009).

2.4 Biogeneze

2.4.1 Transkripce

Transkripce genů pro miRNA je prvním krokem v biogenezi těchto molekul. MiRNA jsou v jádře přepisovány RNA polymerázou typu II (RNA pol II), na 5'konci mají methylguanosinovou čepičku a na 3'konci je poly(A) sekvence (Cai *et al.*, 2004). Při studiu intergenových miRNA byla provedena analýza počátečních míst transkripce a vazebných míst pro transkripční faktory, predikce vzniku CpG ostrůvků, analýza 3'a 5'konců. Na základě těchto analýz byla stanovena průměrná délka primárního transkriptu na 3 až 4 kb s jasným počátečním místem transkripce a poly(A) signálem na jeho konci (Saini *et al.*, 2007).

Už od objevu miRNA se objevovaly názory, že přepis genů miRNA by mohla vykonávat také RNA polymeráza typu III (RNA pol III). Je to polymeráza, která přepisuje jiné krátké nekódující molekuly RNA, např. transferové RNA a 5S ribosomální RNA. V roce 2006 bylo zveřejněno 46 lidských miRNA, které jsou přepisovány polymerázou typu III. Všechny tyto miRNA se nacházejí v jednom klastru na chromosomu 19, používá se pro něj označení C19MC. MiRNA jsou zde rozptýleny mezi Alu repetitivy, které jsou nejčastěji transponovaným elementem v lidském genomu. Alu sekvence obsahují promotor pro RNA pol III, která tak přepisuje rovněž geny z klastru C19MC (Borchert *et al.*, 2006). V roce 2009 byla uvedená studie zpochybněna. Hlavními argumenty bylo, že téměř 82 % domnělých promotorů leží v opačném směru než kódované miRNA. Navíc se ve správném směru před geny miRNA nachází poly(T) sekvence (4 až 5 tyminů), které jsou stop signálem pro RNA pol III. Zároveň byl objeven nový gen pro nekódující RNA, v jehož intronu se klastr nachází a jehož exprese je omezena výhradně na placentární tkáň. Transkript genu provádí RNA pol II. Není vyloučeno, že by ojediněle mohlo docházet ke vzniku kratších nebo méně stabilních transkriptů miRNA RNA polymerázou III (Bortolin-Cavaillé *et al.*, 2009).

2.4.2 Maturace

Druhým krokem je sestřih pri-miRNA, který probíhá v jádře buňky. Sestřih provádí endonukleáza Drosha ve spolupráci s proteinem DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8), bez ohledu na skutečnost, zda se jedná o monocistronní nebo polycistronní transkript. Společně vytváří komplex nazývaný Mikroprocesor; protein DGCR8 má dvě vazebné domény pro dsRNA, rozeznává strukturu pri-miRNA a pomáhá správně orientovat katalytickou podjednotku enzymu Drosha (Faller *et al.*, 2010). Tato endonukleáza je typickým představitelem RNA endonukleáz typu III, štěpí oba řetězce RNA v blízkosti primární vlásenky. Na 5'konci zůstává fosfátová skupina, 3' konec zůstává delší přibližně o 2 nukleotidy. Vzniká tak prekurzor miRNA o délce 60 až 80 nukleotidů, označovaný jako pre-miRNA. Klíčovým krokem v biogenezi miRNA je transport pre-miRNA z jádra do cytoplazmy. Export z jádra a import do jádra zabezpečují proteiny z rodiny karyopherinů, které jsou závislé na Ran-GTP. Konkrétním přenašečem v případě pre-miRNA je Exportin-5 (Yi *et al.*, 2003). Exportin-5 interaguje s dsRNA (tzn. pre-miRNA) nezávisle na její sekvenci (Bohnsack *et al.*, 2004).

Druhý konec pre-miRNA upravuje v cytoplazmě enzym Dicer, který patří také do skupiny RNA endonukleáz typu III. Rozeznává dvouřetězcovou pre-miRNA díky fosfátu na 5'konci a přesahu dvou bází na 3'konci. Sestřih obou řetězců RNA probíhá vždy ve stejné vzdálenosti od vlásenky – přibližně dvě otočení na helixu. Protože Dicer patří do stejné skupiny enzymů jako Drosha, vypadá po sestřihu druhý konec totožně jako první: 3'konec je přibližně o dva nukleotidy delší než 5'konec, na kterém je fosfát. Vzniká molekula dsRNA, kde jeden řetězec tvoří maturovaná miRNA a druhý řetězec tvoří fragment o stejné délce, který je vytvořen z komplementárního vlákna pre-miRNA. Komplementární vlákno nese označení stejné miRNA, jeho název doplňuje hvězdička. Po sestřihu Dicerem je tedy vytvořen duplex miRNA: miRNA* (Winter *et al.*, 2009).

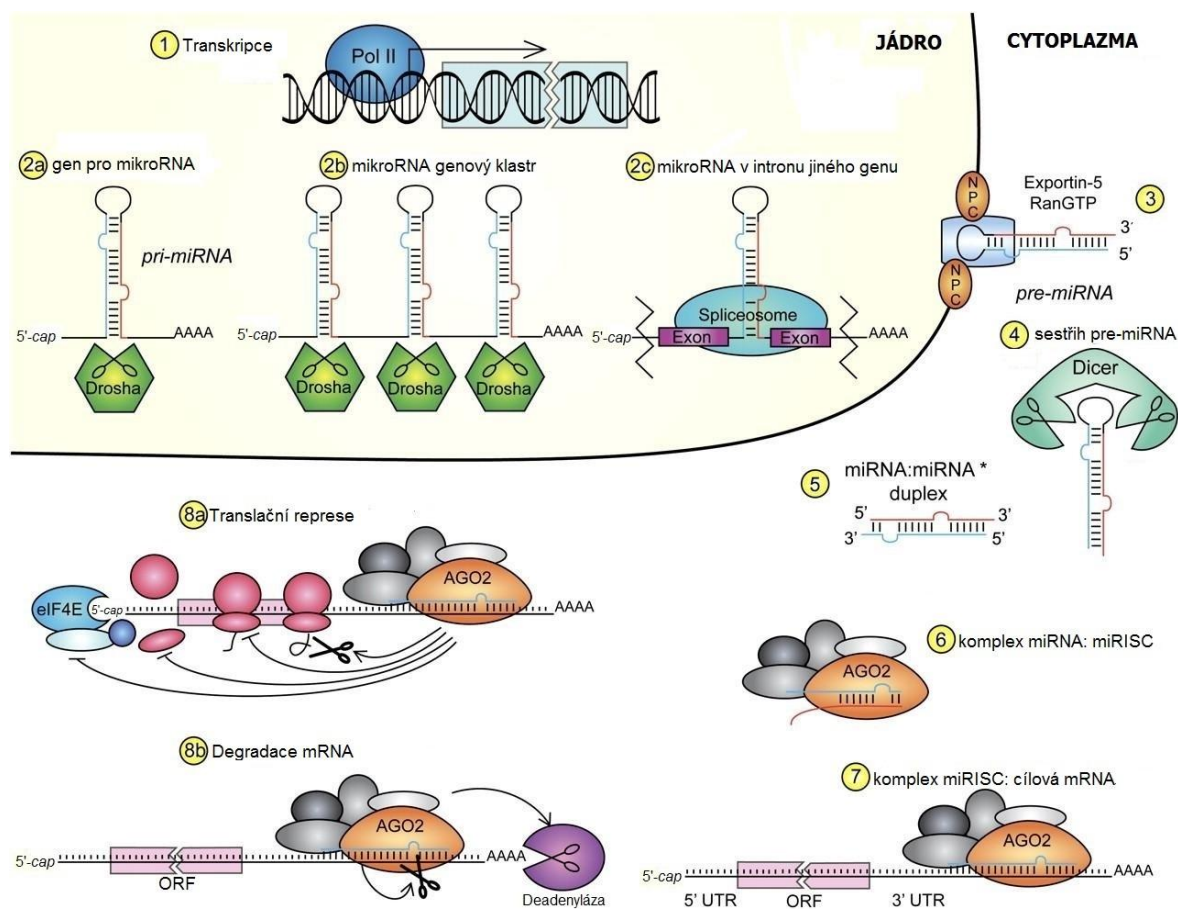
Posledním krokem v biogenezi miRNA je zakomponování jednoho vlákna miRNA do komplexu RISC = RNA induced silencing complex, který funguje jako finální efektor. Někdy se také používá název mikroribonukleoproteinový komplex (miRNP). RISC se skládá z enzymu Dicer, proteinu Argonaut2 (Ago2) a dalších RNA vazebných proteinů. Rozvolnění obou vláken miRNA provádí ATP-dependentní helikázy. Přítomnost helikázy však není nezbytná, protein Ago2 je schopen řetězce rozvolnit a zakomponovat jeden z nich do komplexu RISC (Araldi a Schipani, 2010). Zpravidla je do komplexu RISC zabudováno to vlákno z původního duplexu miRNA: miRNA*, jehož 5'konec je méně stabilní (Khvorova *et al.*, 2003). Celý proces biogeneze miRNA je schematicky znázorněn na obrázku č. 1.

RISC se uplatňuje také v procesu RNA interference (RNAi), po sestřihu Dicerem se mechanismus RNAi velice podobá principu fungování miRNA.

2.5 Regulace genové exprese

Regulace genové exprese pomocí miRNA probíhá dvěma odlišnými mechanismy, nezbytná je přítomnost proteinu Ago-2. Maturovaná miRNA je zabudována do komplexu RISC, který způsobuje degradaci cílové mRNA nebo svou přítomností zablokuje translaci. Záleží přitom na komplementaritě miRNA a cílové sekvence mRNA, zejména v oblasti druhého až osmého nukleotidu miRNA (Hutvagner and Zamore, 2002). Translační represe může probíhat dvěma způsoby. První možnost spočívá v předčasném ukončení syntézy polypeptidového řetězce. Podstatou druhého způsobu je kompetice proteinu Ago2 a iniciačního faktoru eIF4E o vazebné místo na methylguanositové čepičce (5'cap). Vazba

eIF4E na 5' *cap* je důležitá pro správné nasměrování ribozomů. Degradace mRNA probíhá také dvěma způsoby. V případě úplné komplementarity dochází k rozštěpení mRNA prostřednictvím proteinu Ago-2. Při neúplné komplementaritě se komplex RISC/miRNA podílí na úpravě poly(A) konce tak, aby byl přístupný deadenyláze. V obou případech není v buňce syntetizováno dostatečné množství proteinu (Araldi a Schipani, 2010). Zároveň už byla objevena lidská miR-369-3, která translaci aktivuje (Vasudevan *et al.*, 2007).



Obr. 1 Biogeneze miRNA

Přepis genů provádí enzym RNA polymeráza typu II (1), transkript je označován jako pri-miRNA. Geny pro miRNA se nacházejí samostatně (2a) nebo v klastrech (2b), jejich sestřih provádí enzym Drosha. Pokud se nacházejí v intronech jiných genů, jsou vystřiženy sestřihovým aparátem buňky (tzv. spliceozom; 2c). Transport pre-miRNA z jádra probíhá pomocí Exportinu-5 a RanGTP (3). V cytoplasmě následuje sestřih pomocí enzymu Dicer (4), vzniká duplex miRNA:miRNA* s přesahem dvou nukleotidů na 3' koncích (5). Jedno vlákno z duplexu je zakomponováno do komplexu RISC, kde hraje ústřední roli protein Ago2 (6). Celý komplex se váže na komplementární místo v 3' UTR oblasti mRNA (7) a reguluje proces translace (8a, 8b).

Upraveno podle Araldi a Schipani, 2010.

2.6 Kritéria pro zařazení mezi mikroRNA

MiRNA jsou identifikovány pomocí následujících kritérií, která se týkají jejich exprese a biogeneze. Kritéria pomáhají lépe odlišit miRNA od siRNA nebo od fragmentů jiných RNA. Pro zařazení mezi miRNA není třeba, aby byly splněny všechny uvedené body (Ambros *et al.*, 2003).

Kritéria exprese:

- i. V buňce lze detekovat transkript RNA dlouhý ~ 22 nt, obvykle pomocí metody Northern blot.
- ii. Lze identifikovat ~ 22 nt sekvenci v knihovně cDNA; sekvence musí přesně odpovídat genomické sekvenci organismu, ze kterého byla domnělá miRNA izolována.

Kritéria biogeneze:

- i. Sekundární strukturou prekurzoru zkoumané sekvence je u živočichů vlásenka o délce 60 až 80 nukleotidů – pro danou molekulu to musí být sekundární struktura s nejnižší hodnotou volné energie. Obsahuje minimálně 16 párů bazí – tyto páry tvoří zkoumaná miRNA a druhé raménko vlásenky. Sekundární struktura by neměla obsahovat rozsáhlé vnitřní smyčky.
- ii. Predikovaný prekurzor i maturovaná sekvence miRNA jsou z hlediska fylogeneze konzervovány. Pokud je konzervovaným prekurzorem vlásenka, měla by splňovat stejná kritéria párování z předchozího bodu, ale nemusí být strukturou s nejnižší volnou energií.
- iii. V případě snížené funkce enzymu Dicer se v buňce hromadí zvýšené množství prekurzoru.

2.7 Stabilita a transport extracelulárních mikroRNA

Cirkulující miRNA jsou stabilní a odolné vůči enzymům s Rnázovou aktivitou. Vysoká stabilita neplatí pro syntetické miRNA, které jsou do plazmy přidány dodatečně. Cirkulující miRNA jsou transportovány v exosomech, mikropartikulích, apoptotických tělíscích nebo v komplexu s proteiny a lipoproteiny, které je chrání před degradací (Wang *et al.*, 2010).

Exosomy jsou malé váčky o velikosti 50 – 90 nm, které buňkami sekretovány do extracelulárního prostoru. Vytváření exosomů závisí na příjmu vápníku, množství kalpainu (proteáza závislá na vápníku), reorganizaci cytoskeletu a aktivitě enzymu sphingomyelináza 2 (Kosaka *et al.*, 2010). V exosomech se nachází miRNA i mRNA, některé miRNA jsou selektivně zadržovány v buňce, obsah exosomů proto nemusí odpovídat skladbě miRNA v mateřské buňce (Pigati *et al.*, 2010). Transport v exosomech potvrdila také studie extracelulárních miRNA, kde byl vzorek filtrován přes membránu s velikostí pórů až 0,22 μm . Koncentrace zkoumané miR-141 se po filtraci nezměnila, což potvrdilo přítomnost exosomů (Chim *et al.*, 2008).

Mikropartikule jsou větší než exosomy, jejich průměr je více než 100 nm a také obsahují miRNA. Tvorba mikropartikulí je závislá na intracelulární koncentraci vápníku, reorganizaci cytoskeletu a změnách v organizaci fosfolipidové cytoplazmatické membrány. Mikropartikule mohou přenášet také chemokiny, receptory, adhezivní molekuly a lipidy (Prokopi *et al.*, 2009). Přítomnost miRNA byla prokázána v mikropartikulích původem z žírných buněk, monocytů a endoteliálních buněk (Zhang *et al.*, 2010).

Apoptotická tělíska jsou největšími částicemi, které se uplatňují v intravesikulárním transportu miRNA. Vznikají při programované buněčné smrti a jejich pohlcení fagocyty spouští sekreci cytokinů a růstových faktorů (Hristov *et al.*, 2004). Apoptotická tělíska, která pocházejí z endoteliálních buněk, vykazují výrazně vyšší zastoupení miR-126. MiR-126 hraje důležitou roli v regulační dráze vaskulárního a fibroblastového růstového faktoru (VEGF a FGF), konkrétně inhibuje dva negativní regulátory VEGF (Wang *et al.*, 2008).

Mimo vesikuly mohou být miRNA přenášeny dvěma způsoby. Prvním způsobem je začlenění miRNA do lipoproteinového komplexu HDL (high-density lipoprotein). Zastoupení konkrétních miRNA v komplexu se liší u zdravých jedinců a pacientů s hypercholesterolémií (Vickers *et al.*, 2011). Druhým způsobem je transport miRNA společně s proteiny, které je chrání před degradací. Prokázán byl transport komplexu Ago2-miRNA. Protein Ago2 se v buňce účastní finálního kroku v regulaci translace mRNA. Prozatím není jasné, zda je komplex Ago2-miRNA schopen regulovat translaci i v hostitelské (recipientní) buňce (Arroyo *et al.*, 2011). Dalším proteinem s protektivním účinkem je nukleophosmin (NPM1). V komplexu s miRNA byly nalezeny i další proteiny, ale nebyl prokázán jejich ochranný vliv (Wang *et al.*, 2010).

2.8 Detekce mikroRNA a metody normalizace dat

V současné době se k detekci miRNA používají dvě hlavní metody – kvantitativní PCR (qPCR) a metoda mikročipů (microarray). Obě metody se většinou používají v rámci jedné studie. Pomocí mikročipů se nejprve vytipují miRNA se změněnou genovou expresí a pomocí PCR se provádí validace exprese příslušných genů.

2.8.1 Kvantitativní PCR v reálném čase

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je jednou z nejrozšířenějších metod molekulární biologie, publikována byla v roce 1987 (Mullis a Faloona, 1987). Podstatou PCR je amplifikace určité části genomu. Při teplotě 95 °C dochází k denaturaci původní dvouvláknové DNA, při teplotě okolo 60 °C dochází k navázání primerů a syntéze nového řetězce díky přítomnosti termostabilní DNA polymerázy. Tyto dvě teploty se střídají, počet cyklů si určuje autor výzkumu. Nejčastěji je používána DNA polymeráza z bakterie *Thermus aquaticus*, která se označuje jako Taq polymeráza. Vizualizace výsledného produktu je možná pomocí fluorescenčních molekul. Dříve bylo využíváno interkalační barvivo ethidium bromid, jehož fluorescence se zvyšuje v přítomnosti dvouvláknové DNA (Higuchi *et al.*, 1992). Od roku 1991 začal vývoj specifických fluorescenčních sond, které hybridizují k cílové sekvenci a využívají vlastností Taq polymerázy (Holland *et al.*, 1991; Livak *et al.*, 1995).

PCR v reálném čase je modifikací klasické polymerázové řetězcové reakce. Hlavní výhodou metody je kvantifikace výsledného produktu bez nutnosti použití další metody (např. elektroforézy). Množství produktu je měřeno na základě detekce fluorescenčního signálu. Je možné provést kvantifikaci absolutní nebo relativní. Absolutní kvantifikace přímo určí počet kopií daného genu na počátku reakce ze standardní křivky. Relativní kvantifikace měří genovou expresi ve vztahu k jinému genu (tzv. housekeepingový gen), který se vyznačuje stálou expresí ve zkoumaných buňkách (Heid *et al.*, 1996).

Fluorescenční signál je měřen a zaznamenáván na konci každého cyklu. Jednou z možností je využití barviva SYBR Green, které se váže nespecificky na dvouřetězcovou DNA. Druhá možnost využívá specifické fluorescenční sondy. Nejrozšířenější jsou tzv. TaqMan sondy. Na 5'konci mají fluorescenční reportérovou barvu, na 3'konci ji doplňuje druhá fluorescenční barva, která má funkci zhášedce. Během hybridizační fáze dochází k vazbě přímého a zpětného primeru i k hybridizaci sondy k cílové sekvenci. Dokud je

sonda neporušená, k žádné fluorescenci nedochází. Během elongační fáze dochází k postupnému odbourání sondy směrem od 5'konce Taq DNA polymerázou. Oddálení reportérové barvy od zhášedce vyvolá emisi záření. Celý proces se s každým cyklem opakuje a s rostoucím množstvím produktu se zesiluje i fluorescenční signál (Snider *et al.*, 2001). V momentě, kdy fluorescence přesáhne stanovený práh, se zaznamená číslo cyklu s přesností na čtyři desetinná místa. Toto číslo se nazývá Ct (threshold cycle = prahová hodnota) a pracuje se s ním při následné analýze.

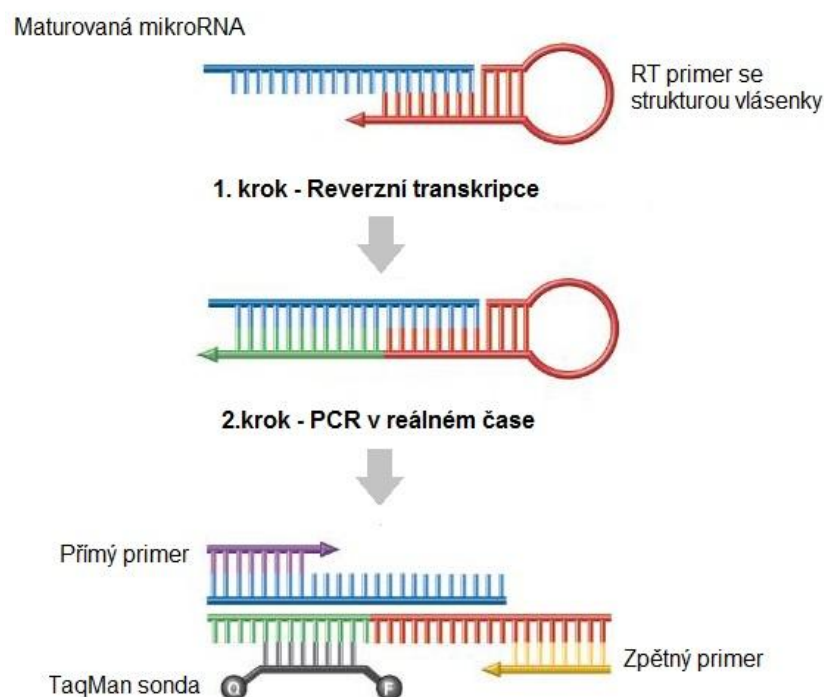
PCR v případě miRNA přináší několik komplikací:

- i. molekuly miRNA jsou příliš krátké, neposkytují dostatečně dlouhou sekvenci k navržení vhodného primeru,
- ii. minimální rozdíly v sekvencích jednotlivých miRNA,
- iii. v buňce se nacházejí také prekurzory miRNA (pri-miRNA a pre-miRNA), které mají uvnitř molekuly stejnou sekvenci jako finální maturovaná miRNA.

Byly vyvinuty dvě modifikace qPCR, které se používají k detekci miRNA. Liší se v typu používaných primerů pro reverzní transkripci. První možností je použít primery se strukturou vlásenky (tzv. stem-loop primery). Tyto primery mají na 3'konci sekvenci šesti nukleotidů, která je komplementární se sekvencí na 3'konci konkrétní miRNA. Smyčka je tvořena univerzální sekvencí nukleotidů. Reverzní transkriptáza prodlužuje řetězec na 3'konci primeru, čímž dochází k přepisu miRNA do cDNA. Vysoká teplota způsobí denaturaci vlásenky a vzniká jediná delší molekula cDNA. Během PCR je amplifikována s využitím přímého specifického primeru a univerzálního zpětného primeru. Amplifikace způsobí odstranění specifické hydrolyzační TaqMan sondy, čímž dochází ke zvyšování fluorescence ve vzorku (Kang *et al.*, 2012). Schematické znázornění metody je na obrázku č. 2. Následná kvantifikace probíhá na základě měření fluorescence. Metoda je vysoce specifická, ale pro analýzu většího počtu miRNA je z důvodu vysoké ceny TaqMan setů poměrně nákladná.

Druhou možností je využití polymerázy, která na 3'konec miRNA připojí sekvenci adeninů poly(A) – odtud název metody. Primery používané pro reverzní transkripci mají na svém 3'konci poly(T) sekvenci a na 5'konci univerzální sekvenci nukleotidů. Reverzní transkriptáza prodlouží 3'konec primeru, čímž dojde k přepisu miRNA do cDNA.

Analogicky s předchozí metodou se během PCR používají specifické přímé a univerzální zpětné primery (Kang *et al.*, 2012).



Obr. č. 2 – Schéma PCR - použití primeru se strukturou vlásenky

Maturovaná miRNA (modrá) se naváže na RT primer se strukturou vlásenky, na jehož 3' konci je sekvence nukleotidů komplementární k miRNA (červená). Během reverzní transkripce dochází k přepisu miRNA do cDNA (zelená). Během PCR se používají přímý (fialová) a zpětný (žlutá) primer, TaqMan sonda (černá) s reportérem (F) a zhášecem (Q) na obou koncích molekuly. Během syntézy nového řetězce dochází k postupnému odbourání sondy, oddálení reportérové barvy od zhášече vyvolá emisi záření.

Upraveno podle http://www.asuragenservices.com/images/taqman_miRNA_assay.gif

2.8.2 Normalizace dat

Pro normalizaci exprese cirkulujících miRNA v séru nebo plazmě neexistují žádné ověřené *housekeeping* geny. Normalizace dat se tak stává velmi problematickou. Dosud byly stanoveny tři postupy, které lze použít při kvantifikaci miRNA.

První možností je využít jako endogenní kontrolu stabilně exprimovaný gen, který je známý z předchozích studií. V případě miRNA to může být všudypřítomná miR-16 (Wei *et al.*, 2011), malé jaderné RNA, např. RNU6 (Ji *et al.*, 2011), nebo malé jadéřkové RNA, např. RNU44 a RNU48 (Vandesompele *et al.*, 2002). Jako kontrolu je možné využít syntetickou miRNA dodatečně přidanou do vzorku plazmy nebo séra. Syntetická miRNA původem z jiného organismu, která se přidává vždy ve stejném množství do přesného

objemu plazmy nebo séra, může být použita pro detekci variabilit vzniklých mezi jednotlivými experimenty. V současné době se využívají miRNA z *Caenorhabditis elegans*, konkrétně cel-miR-39, cel-miR-54 a cel-miR-238 (Mitchell *et al.*, 2008).

Druhá možnost normalizace dat vyžaduje analýzu několika vytipovaných endogenních kontrol, ze kterých je posléze vybrána nejvhodnější kombinace referenčních genů. Metodu vyvinuli Vandesompele *et al.* (2002), ve své práci otestovali deset běžně používaných *housekeeping* genů (např. beta-aktin, beta-2-mikroglobulin, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza) v různých tkáních. Vytvořili všechny možné dvojice z vybraných genů a porovnali jejich expresi vždy ve dvou různých vzorcích ze stejné tkáně. Došli k závěru, že použití jediného referenčního genu není pro analýzu dat z kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR) dostačující. Vyvinuli algoritmus geNorm, pomocí kterého lze vybrat vhodné referenční geny a jejich geometrický průměr použít jako normalizační faktor pro analýzu dat z qRT-PCR (Vandesompele *et al.*, 2002). Metoda byla původně vyvinuta pro normalizaci mRNA, ale další autoři ji aplikovali také na miRNA (Davoren *et al.*, 2008; Peltier a Latham, 2008).

Třetím způsobem hodnocení je metoda celkového průměru. Nejsou stanoveny žádné referenční geny, k normalizaci slouží naměřené hodnoty zkoumaných miRNA. Metoda je založená na předpokladu, že celková exprese miRNA v buňkách je vždy stejná u zdravých i nemocných jedinců (Mestdagh *et al.*, 2009). Tento způsob hodnocení je vhodný pouze pro analýzu velkého počtu miRNA, ve výše uvedené práci tímto způsobem hodnotili expresi 448 miRNA.

2.9 MikroRNA jako biomarkery

Ideální biomarker by měl splňovat následující kritéria:

- Detekce markeru je možná některou z neinvazivních diagnostických metod, které jsou specifické a dostatečně senzitivní pro studovanou chorobu nebo patologii.
- Detekce markeru je spolehlivá již před nástupem prvních klinických symptomů.
- Hodnoty odrážejí progresi onemocnění nebo se v průběhu terapie mění.
- Snadný přenos z modelových systémů na člověka.

V současné době se k diagnostice používají zejména hladiny specifických proteinů v krvi. Sekretované miRNA nabízejí zajímavou alternativu k proteinům. V tělesných

tekutinách jsou stabilní, sekvence různých miRNA jsou vysoce homologní napříč celou živočišnou říší. Exprese některých miRNA je buď tkáňově specifická, nebo omezená na určité životní stadium, nebo omezená /typická pro biologický stav (Liang *et al.*, 2007).

Základním předpokladem v počátcích studia miRNA jako potenciálních biomarkerů byla skutečnost, že zastoupení miRNA v tělesných tekutinách odráží zastoupení miRNA v postižených tkáních (Gilad *et al.*, 2008). Proto se studium nejprve zaměřilo na miRNA, které byly v buňkách v dostatečném množství. Postupně se ukázalo, že sekrece miRNA je selektivní a cirkulující miRNA nemusí svojí skladbou odpovídat skladbě miRNA v mateřských buňkách (Pigati *et al.*, 2010).

Změna hladiny nebo genové exprese vybraných miRNA v krevní plazmě, séru, moči nebo slinách již byla prokázána u řady chorob. V krevní plazmě u pacientů s akutním infarktem myokardu byla zjištěna vyšší hladina miR-208b a miR-499, které korelovaly s množstvím troponinu v plazmě (Corsten *et al.*, 2010). U pacientek s nádorem prsu byla v séru objevena vyšší genová exprese extracelulární miR-195. Po chirurgickém odstranění nádoru se hladina miR-195 snížila (Heneghan *et al.*, 2010). V moči pacientů s rakovinou močového měchýře byla prokázána vyšší hladina miR-126 vzhledem k miR-125 (Hanke *et al.*, 2010).

3. MikroRNA v těhotenství

Během těhotenství se v těle matky vytváří na přechodnou dobu nový orgán – placenta. Placenta tvoří hranici mezi plodem a matkou, účastní se výměny plynů, živin a odpadních látek. Důležitou funkcí placenty je také sekrece hormonů a růstových faktorů. Placenta zároveň funguje jako bariéra, která chrání plod před celou řadou infekčních mikroorganismů.

3.1 Exprese mikroRNA v placentě

V placentě dochází k expresi velkého množství specifických i všudypřítomných miRNA. Tyto miRNA se podílejí na regulaci diferenciaci trofoblastu, proliferaci, apoptóze, invazi buněk a regulaci angiogeneze. Výhradně v placentě jsou exprimovány geny lokalizované na chromozomu 19q13.41 v klastru C19MC. Jedná se o dosud největší objevený klastr se 46 geny pro miRNA o délce přes 100 kb (Bortolin-Cavaillé *et al.*, 2009). Klastr C19MC se nachází pouze u primátů a uplatňuje se zde genomový imprinting. Exprimovány jsou pouze geny z paternálního chromozomu (Noguer-Dance *et al.*, 2010). Druhý velký klastr s 52 geny pro miRNA (C14MC) se nachází na chromozomu 14q32. Jeho exprese je rovněž omezená na placentu a vyvíjející se embryo. Také zde se uplatňuje genomový imprinting, exprimovány jsou geny z maternálního chromozomu (Seitz *et al.*, 2004). V těsné blízkosti klastru C19MC na chromozomu 19 se nachází klastr miR-371-3. Kóduje pouze tři miRNA a jeho exprese je dominantní v placentě (Bentwich *et al.*, 2005) a v embryonálních kmenových buňkách (Laurent *et al.*, 2008).

Exprese placentárně specifických miRNA v klastrech C14MC a C19MC je řízená epigeneticky. Před oběma klastry se nacházejí regulační oblasti, které jsou ve všech tělních buňkách kromě placenty hypermethylované. V placentární tkáni se tato místa naopak vyznačují nízkou metylací (Tsai *et al.*, 2009).

Během těhotenství se exprese placentárně specifických miRNA v buňkách trofoblastu mění. Hladiny miRNA kódovaných v klastru C19MC na chromozomu 19 s přibývajícím týdnem těhotenství rostou (Kotlabová *et al.*, 2011; Hromadnikova *et al.*, 2012). MiRNA kódované v klastru na chromozomu 14 vykazují opačnou tendenci, jejich hladina klesá (Morales-Prieto *et al.*, 2012). Mění se hladiny miRNA v průběhu těhotenství naznačují jejich odlišnou roli a různé uplatnění v rámci ontogeneze.

Regulace exprese dalších miRNA v placentě není příliš dobře prostudována. Prokázána byla reakce některých miRNA na hypoxii v buňkách. In vitro byly v hypoxických podmínkách pozorovány vyšší hladiny miR-93, miR-205, miR-224, miR-335, miR-451 a miR-491. Nižší exprese byla pozorována u miR-424 (Mouillet *et al.*, 2010). Potvrzená je vyšší exprese miR-210 v hypoxických podmínkách v mnoha buněčných typech včetně trofoblastu. Gen pro miR-210 se nachází v intronu genu *AK123483* na chromosomu 11, jehož transkripce je řízená právě hypoxií (Camps *et al.*, 2008). U pacientek s preeklampií byla vyšší exprese miR-210 v placentě publikována řadou autorů (Pineles *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2009; Enquobahrie *et al.*, 2011; Ishibashi *et al.*, 2012).

3.1.1 Exprese mikroRNA v placentě pacientek s těhotenskými komplikacemi

Exprese miRNA je zkoumána u preeklampsie, předčasných porodů, fetální růstové retardace (SGA a IUGR) a gestačního diabetu mellitus. Těhotenské komplikace typu preeklampsie nebo FGR souvisejí s nedostatečnou nebo nesprávnou funkcí placenty.

Preeklampsie se projevuje zvýšeným krevním tlakem a vysokým obsahem bílkovin v moči matky. Příčiny vzniku preeklampsie jsou nejasné. Symptomy jsou způsobeny nedostatečnou invazí trofoblastů do deciduy a myometria (děložní svaloviny), dále dochází k nedostatečné remodelaci mateřských spirálních arterií. V souvislosti s patogenezí PE jsou miRNA intenzivně studovány, většina prací se zaměřuje na různé miRNA včetně placentárně specifických. Bylo identifikováno velké množství miRNA s vyšší i nižší expresí u pacientek s PE v porovnání s fyziologickým průběhem těhotenství. Konkrétní práce zabývající se studiem miRNA jsou uvedeny v příložené tabulce č. 1. V některých případech se jednotlivé studie rozcházejí. Ve stejném roce byly publikovány dvě práce, které zkoumaly expresi miR-195. Zatímco podle jednoho autora byla v preeklamptických placentách zvýšená exprese miR-195 (Hu *et al.*, 2009), druhý autor uvádí u PE sníženou expresi miR-195 v placentě (Zhu *et al.*, 2009). Oba používali stejnou detekční metodu. Během izolace miRNA z placenty se v poměru k její velikosti odebírá velmi malá část tkáně (řádově v desítkách mg). Rozdíly by mohly být způsobeny náhodným rozložením miRNA v tkáni i lokalizací místa odběru.

U pacientek s intrauterinní růstovou retardací (IUGR) byla nalezena snížená genová exprese sedmi vybraných miRNA. Jedná se o miR-518b, miR-1323, miR-516b,

miR-515-5p, miR-520h, miR-519d a miR-526b (Higashijima *et al.*, 2013). Všechny tyto miRNA jsou placentárně specifické a kódovány jsou klastrem C19MC. U pacientek s plody malými vzhledem ke gestačnímu věku (SGA) byla pozorována nižší genová exprese miR-16 a miR-21 v placentě (Maccani *et al.*, 2011).

Tabulka č. 1 Přehled miRNA s odlišným expresním profilem v placentách pacientek s preeklampií – dosavadní studie

Onemocnění	Tkáň	Velikost souboru	Metoda	Výsledky	Autor
preeklampsie	placenta	celkem 36: 9 PE, 9 SGA, 9 PE + SGA, 9 FG	TaqMan MicroRNA Assays Human Panel - Early Access Kit	↑ miR-154*, miR-155, miR-181b, miR-182, miR-182*, miR-183, miR-200b, miR-210	Pineles <i>et al.</i> , 2007
preeklampsie	placenta	celkem 50: 24 závažná PE, 26 FG	Mikročipy, PCR v reálném čase	↑ miR-16, miR-29b, miR-195, miR-26b, miR-181, miR-222	Hu <i>et al.</i> , 2009
preeklampsie	placenta	celkem 34: 8 mírná PE, 15 závažná PE, 11 FG	Mikročipy, PCR v reálném čase	↑ miR-181a, miR-584, miR-30a-3p, miR-210, miR-517*, miR-518b, miR-519e*, miR-638, miR-296, miR-362 ↓ miR-101, miR-10b, miR-218, miR-590, miR-204, miR-32, miR-126*, miR-18a, miR-19a, miR-411, miR-377, miR-154*, miR-625, miR-144, miR-195, miR-150, miR-1, miR-18b, miR-363, miR-542-3p, miR-450, miR-223, miR-374	Zhu <i>et al.</i> , 2009
preeklampsie	placenta	celkem 21: 7 PE, 7 spontánní předčasný porod, 7 FG	Mikročipy, PCR v reálném čase	↓ miR-15b	Mayor-Lynn <i>et al.</i> , 2011
preeklampsie	placenta	celkem 40: 20 PE, 20 FG	Mikročipy, PCR v reálném čase	↑ miR-210 ↓ miR-1, miR-34c-5p, miR-139-5p, miR-328, miR-500, miR-584, miR-1247	Enquobahrie <i>et al.</i> , 2011
preeklampsie	placenta (trvalé preparáty)	celkem 10: 5 PE, 5 FG	PCR v reálném čase	↑ let-7b, miR-104, miR-128a, miR-133b, miR-182*, miR-302	Noack <i>et al.</i> , 2011
preeklampsie	placenta	celkem 20: 10 PE, 10 FG	Mikročipy, PCR v reálném čase	↑ miR-17, miR-20a, miR-20b	Wang <i>et al.</i> , 2012
preeklampsie	placenta	celkem 18: 8 PE, 10 FG	Sekvenování, kvantitativní PCR	↑ miR-10b, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-22, miR-126, miR-142-3p, miR-144, miR-146b-3p, miR-185, miR-193b, miR-193b*, miR-210, miR-451, miR-517c, miR-518c, miR-518f, miR-519e, miR-520a-3p, miR-525-5p, miR-526b, miR-590-5p	Ishibashi <i>et al.</i> , 2012

PE = preeklampsie, FG = fyziologická gravidita, SGA = konstitučně malý novorozenec; ↑ vyšší genová exprese, ↓ nižší genová exprese

3.2 MikroRNA v mateřské cirkulaci

V roce 2007 byla publikována práce Valadiho, ve které byl popsán mechanismus přenosu RNA mezi jednotlivými buňkami v těle. Transfer probíhá prostřednictvím exosomů. Identifikováno bylo přibližně 1300 mRNA transkriptů a přítomny byly také krátké molekuly RNA včetně miRNA. In vitro studie prokázaly, že mRNA je v recipientních buňkách plně funkční (Valadi *et al.*, 2007). O dva roky později bylo potvrzeno uvolňování exosomů také z placentární tkáně, konkrétně ze syncytiotrofoblastu, do krevního oběhu matky. V exosomech byly nalezeny placentárně specifické miRNA, které tak mohou ovlivňovat genovou expresi v různých tkáních těla matky (Luo *et al.*, 2009).

Vědecké týmy se proto začaly intenzivně věnovat studiu extracelulárních miRNA, které by mohly sloužit jako biomarkery těhotenských komplikací. Již v roce 2008 byla zveřejněna práce, ve které byl porovnáván profil 157 miRNA v hematopoetických buňkách matky a buňkách placenty. Chim *et al.* vycházeli z předpokladu, že většina miRNA v krevním řečišti matky pochází z buněk hematopoetické řady, proto si je vybral ke srovnání. Identifikoval 17 miRNA, které se v placentě nacházely ve více než desetinásobné koncentraci v porovnání s krevními buňkami matky. Z těchto 17 vybral čtyři miRNA s nejvyšší koncentrací v placentě (konkrétně miR-141, miR-149, miR-299-5p, miR-135b) k následné analýze v krevní plazmě. Všechny čtyři miRNA se podařilo v plazmě těhotných žen detekovat. Jejich množství se v plazmě po porodu výrazně snížilo, v některých případech již nebyly po porodu detekovatelné (Chim *et al.*, 2008).

Ve stejném roce byla publikována podobná práce, ve které byly zkoumány placentárně specifické miRNA. Bylo vytipováno 28 miRNA, které v předchozích studiích vykazovaly dominantní expresi v placentě. Všechny vybrané miRNA byly v plazmě detekovatelné, tři z nich se u těhotných žen vyskytovaly v mnohonásobně vyšší koncentraci (více než 500 krát) než u žen netěhotných. Jednalo se o miR-526a, miR-527 a miR-515-5p. Na základě jejich množství bylo možné odlišit těhotné a netěhotné ženy (Gilad *et al.*, 2008).

Rozsáhlou analýzu zveřejněnou v roce 2010 provedli Miura *et al.* (Miura *et al.*, 2010). Pomocí mikročipů provedl screening u 723 miRNA a vybral všechny, které měly alespoň stokrát silnější signál v tkáni placenty než v krevních buňkách matky. Následně

provedl PCR v reálném čase a z 82 vybraných miRNA identifikoval 24 placentárně specifických. Jednalo se o tyto miRNA: miR-515-3p, miR-515-5p, miR-517a, miR-517c, miR-517*, miR-518b, miR-518c, miR-518e, miR-519a, miR-519d, miR-520a-5p, miR-525-5p, miR-526b, miR-498, miR-525-3p, miR-526b*, miR-323-3p, miR-433, miR-411, miR-487a, miR-154*, miR-218, miR-204, miR-141. Uvedené miRNA jsou kódovány převážně na dvou chromosomech v oblastech 19q13.42 a 14q32.31, kde se nachází klastry genů pro miRNA. Pouze tři miRNA jsou kódovány na jiných místech v genomu (miR-218, miR-204, miR-141).

Podobná analýza proběhla i v naší laboratoři v roce 2011. Na základě studií ostatních autorů a databáze miRBase (<http://mirbase.org/>) bylo vybráno 21 miRNA, u kterých byla popsána vysoká exprese v placentě. Dvě miRNA byly vybrány jako endogenní kontroly (miR-16 a let-7d). Přítomnost všech 21 miRNA byla testována v placentě a v krevní plazmě těhotných i netěhotných žen. Protože cílem studie bylo nalézt vhodné biomarkery pro diagnostiku a predikci těhotenských komplikací, byly na plazmách těhotných žen s fyziologickým průběhem gravidity provedeny tři odběry v různých týdnech těhotenství (12., 16. a 36.). Nakonec bylo vybráno sedm placentárně specifických miRNA, které splňovaly následující podmínky:

- v placentě byly detekovány s úspěšností 100 %
- v průběhu celého těhotenství (tzn. ve všech třech provedených odběrech krve) byly detekovány v plazmě alespoň s úspěšností 67 %
- žádnou z vybraných miRNA nelze detekovat v plazmě u netěhotných žen

Vybrané miRNA byly následující: miR-516-5p, miR-517*, miR-518b, miR-520a*, miR-520h, miR-525, miR-526a (Kotlabová *et al.*, 2011). Ve své diplomové práci navazují na tento výzkum a pilotní studii vydanou v roce 2012 (Hromadníková *et al.*, 2012).

3.3 Extracelulární mikroRNA a těhotenské komplikace

Při hledání miRNA s diagnostickým potenciálem se uplatňují dva hlavní postupy. První postup zahrnuje detekci miRNA v placentě u žen s vybranou těhotenskou komplikací a porovnání jejich genové exprese s těhotnými ženami s fyziologickým průběhem gravidity. MiRNA s odlišným expresním profilem v placentě jsou následně analyzovány v krevní plazmě nebo séru. Druhý přístup vynechává detekci miRNA v placentě

a porovnává množství a genovou expresi miRNA v krevní plazmě. MiRNA v krvi, krevní plazmě nebo séru jsou studovány v souvislosti s preeklampií, fetální růstovou retardací, mimoděložním těhotenstvím, opakovanými potraty a gestačním diabetem mellitus (GDM).

Mimoděložní těhotenství je v současné době diagnostikováno pomocí ultrazvukového vyšetření a hodnot hCG v krvi matky. Studium miRNA ukázalo zvýšenou koncentraci miR-323-3p v krevním séru, která by se v kombinaci s vyšetřením hodnot hCG a progesteronu mohla v některých komplikovaných případech stát vhodnou diagnostickou metodou mimoděložního těhotenství (Zhao *et al.*, 2012).

V souvislosti s opakovanými potraty byly zkoumány polymorfismy v genech pro miRNA. Za opakované potraty jsou považovány alespoň tři předcházející těhotenství ukončená před 20. týdnem spontánním potratem. Prozatím byly provedeny studie pouze na asijské populaci a identifikováno bylo pět polymorfismů ve třech různých miRNA (miR-125a, miR-196a, miR-499), které korelovaly s výskytem opakovaných potratů (Hu *et al.*, 2011; Jeon *et al.*, 2012).

Rovněž pro rozvoj GDM byly identifikovány tři miRNA s diagnostickým potenciálem, konkrétně miR-29a, miR-222 a miR-132. Snížená genová exprese uvedených miRNA v séru byla pozorována zhruba 10 týdnů před prvními klinickými projevy GDM (Zhao *et al.*, 2011).

Pravděpodobně nejintenzivnější studium probíhá ve vztahu k preeklampsii a fetální růstové retardaci (IUGR a SGA). U pacientek s SGA plody byla provedena analýza šesti extracelulárních miRNA, z nichž dvě miRNA vykazovaly sníženou genovou expresi. Konkrétně se jednalo o miR-16 a miR-21 (Maccani *et al.*, 2011). U pacientek s IUGR prozatím nebyl pozorován rozdíl v plazmatických hodnotách miRNA mezi patologickým a fyziologickým průběhem gravidity (Higashijima *et al.*, 2013). Preeklampsie je jednou z těhotenských komplikací, při které dochází k abnormální placentaci, proto je u pacientek intenzivně studován profil placentárně specifických miRNA. Dosavadní výzkumy a jejich výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2 Přehled extracelulárních miRNA s odlišným expresním profilem u pacientek s preeklampsii – dosavadní studie

Přehled extracelulárních miRNA s odlišným expresním profilem u pacientek s preeklampsii					
Onemocnění	Tkáň	Velikost souboru	Metoda	Výsledky	Autor
preeklampsie	sérum	celkem 5: 2 mírná PE, 2 vážná PE, 1 FG	Sekvenování nové generace (NGS)	<p>↑ let-7a*, let-7f-1*, miR-29a, miR-125a-5p, miR-125b, miR-136, miR-517b, miR-517c, miR-518e, miR-519a, miR-519d, miR-520g, miR-520h, miR-521, miR-542-3p</p> <p>↓ let-7d, let-7f, miR-185, miR-223, miR-320c, miR-1260, miR-1272</p>	Yang <i>et al.</i> , 2011
preeklampsie	plazma	celkem 19: 10 vážná PE, 9 FG	Mikročipy, PCR v reálném čase	<p>↑ miR-24, miR-26a, miR-103, miR-130b, miR-181a, miR-342-3p, miR-574-5p</p>	Wu <i>et al.</i> , 2011
preeklampsie	plazma	celkem 40: 20 vážná PE, 20 FG	PCR v reálném čase	<p>↑ miR-210, ↓ miR-152</p>	Gunel <i>et al.</i> , 2012
preeklampsie	plazma	celkem 45: 15 vážná PE, 15 mírná PE, 15 FG	PCR v reálném čase	<p>↑ miR-210</p>	Zhang <i>et al.</i> , 2012

PE = preeklampsie, FG = fyziologická gravidita; ↑ vyšší genová exprese, ↓ nižší genová exprese

MiRNA s diagnostickým potenciálem pro těhotenské komplikace nemusí být nutně placentárně specifické. Takovým příkladem je např. miR-210, jejíž expresi podporuje tkáňová hypoxie (Zhang *et al.*, 2012).

Pilotní studie provedená v naší laboratoři se zabývala preeklampsii a fetální růstovou retardací, ale z důvodu malého počtu vzorků neukázala statisticky významný rozdíl v množství a expresi vybraných miRNA mezi fyziologickým a patologickým průběhem gravidity (Hromadníková *et al.*, 2012).

4. Těhotenské komplikace

4.1 Hypertenze v těhotenství

Hodnota krevního tlaku nad 140/90 mmHg je všeobecně považována za hypertenzi (Zanchetti, 2003). Klasifikace hypertenze v těhotenství (Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy, 2000):

- Preeklampsie – klinická manifestace hypertenze a proteinurie po 20. týdnu gravidity, rozlišuje se mírná a závažná forma.
- Eklampsie – záchvaty tonicko-klonických křečí, navazují na těžkou preeklampsii.
- Chronická hypertenze (preexistující hypertenze) – trvalá systolická i diastolická hypertenzní choroba diagnostikovaná před těhotenstvím nebo před 20. týdnem gravidity.
- Preeklampsie superponovaná na předchozí hypertenzi – preeklampsie, která se objevila u pacientky s dříve diagnostikovanou chronickou nebo gestační hypertenzí.
- Gestační hypertenze – hypertenze s klinickou manifestací po 20. týdnu těhotenství bez výskytu proteinurie, někdy se používá označení přechodná. U některých pacientek hypertenze přetrvává i po 12 týdnech po porodu, pak se z gestační hypertenze stává hypertenze chronická.

4.2 Preeklampsie

Preeklampsie (PE) je syndrom, který se objevuje po 20. týdnu těhotenství a projevuje se zvýšeným krevním tlakem a proteinurií. Celosvětově se preeklampsie objevuje u 3-5 % těhotných žen a zejména v rozvojových zemích je hlavní příčinou smrti matky během těhotenství (Whitworth, 2003). V těžkých případech je neprodleně ukončeno těhotenství porodem plodu.

Nejvíce rizikovou skupinou jsou prvorodičky, u kterých je prevalence preeklampsie až 7,5 % (Whitworth, 2003). Podobné riziko se objevuje i u žen, které jsou opakovaně gravidní, avšak s novým partnerem (Tuffnell *et al.*, 2005). Vyšší riziko je také u žen s preeklampsii v minulé graviditě (příp. minulých graviditách) a při výskytu PE u příbuzných prvního stupně. S vyšším rizikem vzniku PE jsou spojeny následující zdravotní problémy: chronická hypertenze, diabetes mellitus, onemocnění ledvin, obezita, nadměrná srážlivost krve (např. Leidenská mutace). Vyšší riziko výskytu PE je u vícečetných

těhotenství a moly hydatidózy (nádor trofoblastu) – zřejmě kvůli větší velikosti placenty. Kouření během těhotenství je faktorem, který riziko vzniku PE snižuje (England *et al.*, 2002).

4.2.1 Diagnostika a dělení preeklampsie

Hlavní příznaky:

- hypertenze – manifestace po 20. týdnu těhotenství; hodnota systolického tlaku ≥ 140 mmHg nebo diastolického tlaku ≥ 90 mmHg, provádí se dvě měření po 6 hodinách; lze definovat také jako zvýšení systolického tlaku o 30 mmHg nebo diastolického o 15 mmHg,
- proteinurie – ≥ 300 mg proteinů v moči za 24 hodin.

Další příznaky:

- otoky,
- zvýšená hladina močoviny v krvi,
- nedostatek krevních destiček,
- zvýšené množství kreatininu v krvi.

Podle závažnosti příznaků se preeklampsie dělí na závažnou (severe) a mírnou (mild). Podle kritérií ACOG (American College of Obstetrics and Gynecology; Bulletins--Obstetrics ACoP., 2002) je PE považována za mírnou, když jsou splněny obě základní kritéria (tzn. krevní tlak $\geq 140/90$ a proteinurie ≥ 300 mg proteinů / 24 hodin) a pacientka nemá žádné další potíže. Při závažné preeklampsii je u pacientky přítomen alespoň jeden z následujících příznaků:

- systolický tlak ≥ 160 mmHg a/nebo diastolický tlak ≥ 110 mmHg; provádí se dvě měření s intervalem alespoň 6 hodin, pacientka je v klidovém režimu
- proteinurie ≥ 5 g za 24 hodin,
- množství moči ≤ 500 ml za den (oligurie),
- plicní edém nebo cyanóza,
- poruchy centrálního nervového systému – poruchy vidu? vidění, bolesti hlavy,
- porucha jaterních funkcí – nevolnost, zvracení, bolesti břicha,
- snížený počet krevních destiček,
- intrauterinní růstová retardace (IUGR).

U žen se závažnou PE se může rozvinout syndrom HELLP, charakterizován je hemolýzou, zvýšenou hladinou jaterních enzymů v krvi a nízkým počtem krevních destiček (odtud název syndromu: *Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet*). Syndrom byl poprvé pojmenován v roce 1982 a stal se samostatnou diagnózou, do té doby byl brán jako součást závažné PE (Weinstein L., 1982). V současné době je HELLP považován za samostatné onemocnění nebo za jednu z komplikací závažné PE. Klinické projevy jsou nejčastěji epigastrická bolest nebo bolest v pravém horním kvadrantu břicha, nevolnost a zvracení. Syndrom se v 70 % případů objevuje mezi 27. a 37. týdnem těhotenství, 20 % případů je klinicky manifestováno po 37. týdnu gravidity a 10 % případů se objevuje před 27. týdnem těhotenství (Magann a Martin, 1999). Diagnostická kritéria pro HELLP podle klasifikace z Tennessee jsou následující: počet krevních destiček $\leq 100 \times 10^9/L$, hodnota AST (aspartátaminotrasferáza) ≥ 70 IU/L a hodnota LDH (laktátdehydrogenáza) ≥ 600 IU/L (Sibai, 1990).

Neléčená preeklampsie vede ke vzniku eklampsie, která se projevuje křečovými záchvaty. Je doprovázena ztrátou vědomí. Záchvaty mohou přicházet opakovaně, matku ohrožují zejména krvácením do vnitřních orgánů, plod je ohrožen hypoxií.

4.2.2 Patogeneze preeklampsie

Preeklampsie se objevuje většinou během těhotenství, příznaky po porodu až na výjimky mizí. Přítomnost plodu však pro vznik syndromu není nezbytná, důkazem je rozvoj PE u moly hydatidózy nebo mimoděložního těhotenství. Po odstranění plodu příznaky přetrvávají až do odstranění placenty (Shembrey and Noble, 1995). Proto se studium patogeneze PE soustředí na placentární tkáň.

Během normálního vývoje placenty dochází k invazi extravilózních trofoblastů (fetální původ) do decidui a myometria a k remodelaci mateřských spirálních arterií. Tyto trofoblasty dilatují mateřské spirální arterie, které následně poskytují plodu dostatečnou výživu. U PE je tato přeměna neúplná (Zhou *et al.*, 1997). Invaze trofoblastů do spirálních arterií je omezená pouze na svrchní část zony decidua a části cév v myometriu zůstávají nezměněné a úzké (Meekins *et al.*, 1994). Proces přeměny cytotrofoblastů na buňky s endoteliálním fenotypem se nazývá pseudovaskulogeneze nebo také vaskulární mimikry (Zhou *et al.*, 1997). Cytotrofoblasty snižují expresi adhezivních molekul, které jsou charakteristické pro jejich epiteliální původ a naopak zvyšují expresi endotelových adhezivních molekul. U PE ke změně povrchových molekul nedochází.

Na rozvoji placentárního vaskulárního systému se uplatňují angiogenní faktory a jejich receptory. Pro normální vývoj jsou nezbytné receptory pro vaskulární endoteliální růstový faktor Flt1 (VEGFR1) a Flk1 (VEGFR2). Invazivní trofoblasty exprimují vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), placentální růstový faktor (PlGF, někdy také PGF), a receptor Flt1 (VEGFR1); jejich exprese je u pacientek s PE modifikována (Chaiworapongsa *et al.*, 2004).

In vitro studie ukázaly, že sFlt1 (solubilní Flt1) snižuje schopnost trofoblastů invadovat do cév. Hladiny sFlt1 jsou během těhotenství nízké a během třetího trimestru začínají stoupat. Prozatím není jasné, jestli poruchy dráhy sFlt1 v rané fázi těhotenství mohou zapříčinit vznik PE (Zhou *et al.*, 2002).

Normální těhotenství charakterizuje snížení krevního tlaku a celkového periferního odporu a zvýšení srdečního výdeje. Naopak PE se vyznačuje zvýšeným krevním tlakem, všeobecnou vazokonstrikcí a snížením srdečního výdeje. Zároveň je u nemocných zvýšená senzitivita k vazokonstrikčním faktorům, např. angiotenzinu II a norepinephrinu. Narušená je také schopnost vasorelaxace řízená endotelem, díky níž se zvýšení krevního tlaku projevuje už před klinickou manifestací PE (Khan *et al.*, 2005)

4.2.3 Mechanismy preeklampsie

Preeklampsie je syndrom spojený s abnormální placentací, která je způsobená nedostatečnou invazí cytotrofoblastů do děložních spirálních arterií. Neúplná přeměna cévního systému v placentě může vést k placentární hypoxii, sekreci prozánětlivých cytokinů a uvolňování angiogenních a antiangiogenních faktorů. Hypoxické prostředí může podporovat oxidativní stres a produkci angiogenních faktorů, jejichž účinek je blokován solubilními receptory. Rozvoj hypertenze u pacientek naznačuje souvislost s další hormonální dráhou v těle – systémem renin – angiotenzin a poškozením endotelu. Na patofyziologii PE se podílejí také autoimunitní mechanismy, důležitá je role autoprotilátek proti receptoru typu 1 angiotenzinu II. Přítomnost autoprotilátek má díky cytokinům vliv také na sekreci antiangiogenních faktorů.

Narušení rovnováhy angiogenních a antiangiogenních faktorů hraje v patogenezi preeklampsie klíčovou roli. Zvýšená exprese sFlt1 je doprovázena sníženým množstvím růstových faktorů PlGF a VEGF (Maynard *et al.*, 2003). VEGF stabilizuje endotelové buňky v cévách a je mimořádně důležitým faktorem pro udržování endotelu v ledvinách, játrech a mozku. VEGF signalizace probíhá pomocí dvou receptorů v buněčné membráně –

Flt1 (VEGFR1) a Flk1 (VEGFR2). V krevním řečišti se nachází sestříhová varianta Flt1, tzv. solubilní Flt1 (sFlt1), které chybí transmembránová doména. Do krve je sekretována primárním syncytiotrofoblastem a působí jako antagonist VEGF a PlGF (Clark *et al.*, 1998). Vazbou na sFlt1 nedojde k interakci faktorů s membránovými receptory a žádná signální dráha není aktivována. U preeklampsie je zvýšená exprese Flt1, která způsobuje také vyšší množství sFlt1 v mateřské cirkulaci. Zvýšené hodnoty sFlt1 předcházejí klinickým symptomům a korelují se stupněm závažnosti PE (Levine *et al.*, 2004). Deficience VEGF, která může být způsobena anti-VEGF protilátkami, delecí příslušného genu nebo nadbytkem sFlt1, je pravděpodobně zodpovědná za proteinurii (Sugimoto *et al.*, 2003). Fyziologická role PlGF je méně prozkoumána, pravděpodobně zesiluje signalizaci VEGF. PlGF stimuluje angiogenezi v zánětlivém prostředí, v podmínkách ischemie a při hojení ran (Carmeliet *et al.*, 2001).

Byly objeveny změny i u dalších angiogenních faktorů. Hladiny endostatinu v mateřském séru jsou u pacientek s PE zvýšené (Hirtenlehner *et al.*, 2003). Hlavní funkcí endostatinu je inhibice angiogeneze. Solubilní endoglin, solubilní verze receptoru endoglin, je v krevním řečišti v nadměrném množství. Endoglin jako membránový receptor váže TGF- β (transformující růstový faktor β) a uplatňuje se v procesech angiogeneze a remodelace cév. Solubilní endoglin blokuje signalizaci přes membránový endoglin, neboť váže TGF- β na sebe. Mechanismus je podobný jako u sFlt1 (Levine *et al.*, 2006).

Nedostatek kyslíku a nedostatečné prokrvení tkáně jsou symptomy, které se většinou vyskytují společně. Zatím není jasné, zda je placentární hypoxie a ischemie u pacientek s PE příčinou nebo následkem neúplné remodelace děložních spirálních cév. Nedostatečné množství kyslíku v buňce spouští signalizační kaskádu, ve které hraje ústřední roli rodina proteinů HIF = hypoxia inducible factor (Rajakumar *et al.*, 2004). HIF-1 je transkripční faktor, který aktivuje geny účastnící se krve tvorby a metabolismu železa, angiogeneze a udržování cévního tonu.

U žen s normálním průběhem těhotenství se nacházejí zvýšené hladiny tkáňových hormonů renin, angiotenzin a aldosteron. Osa renin-angiotenzin-aldosteron je jednou z hlavních neurohumorálních drah v organismu, která udržuje fyziologickou homeostázu. Signálem pro sekreci reninu v juxtaglomerulárních buňkách je pokles krevního tlaku. Renin je peptidáza, která odštěpuje z prekursoru angiotenzinogenu (vznik v játrech) angiotenzin I. Angiotenzin I má pouze slabý vazokonstrikční účinek, proto je konvertován

pomocí enzymu ACE (angiotensin converting enzyme) na účinnější angiotenzin II. ACE se nachází zejména v endotelových buňkách plicních cév. Angiotenzin II vyvolává všeobecnou vazokonstrikci, pocit žízně a chuť na slané, snižuje glomerulární filtraci (množství primární moči) a podněcuje sekreci aldosteronu. Krevní tlak i objem plazmy se jeho účinkem normalizují.

Pacientky s PE mají oproti zdravým těhotným ženám v krvi snížené množství reninu, angiotenzinu a aldosteronu. Zároveň mají silnější vaskulární reakci/odpověď na angiotenzin II i další vazokonstrikční faktory. Hypersenzitivita receptorů pro angiotenzin II byla pozorována a popsána již v roce 2001, receptory AT1 (angiotenzin II type 1 receptor) u pacientek s PE dimerizují společně s receptorem pro bradykinin. Vazba na bradykininový receptor zřejmě brání inaktivaci AT1 reaktivními kyslíkovými radikály (AbdAlla *et al.*, 2001). Zapojení imunitního systému do patogeneze PE dokazuje výskyt autoprotilátek proti receptoru AT1 (AT1-AA). Tyto autoprotilátky vazbou na receptor posilují jeho funkci a snižují invazivitu trofoblastu (Xia *et al.*, 2003). Injikované autoprotilátky způsobují u myši zvýšení solubilních molekul (sFlt, sEng) a vyvolávají u nich vznik PE (Zhou *et al.*, 2008).

Nezbytnou podmínkou placentace je tolerance plodu imunitním systémem matky. PE se nejčastěji objevuje u prvorodiček, nebo po změně partnera (Tubbergen *et al.*, 1999), nebo v případě dlouhého intervalu mezi těhotenstvími. Vyšší incidence PE se vyskytuje u žen, které používají bariérovou antikoncepci (Klonoff-Cohen *et al.*, 1989). Naopak neléčené HIV pozitivní ženy mají velice nízkou incidenci PE, po nasazení léčby se riziko zvyšuje (Wimalasundera *et al.*, 2002). Všechny uvedené skutečnosti naznačují, že PE je spojená s abnormální imunitní odpovědí mateřského organismu na paternální antigeny.

Invazi trofoblastu ovlivňuje interakce mezi molekulami HLA-C, které jsou exprimovány buňkami trofoblastu, a receptory na povrchu maternálních NK buněk, tzv. KIR (killer Ig-like receptory). HLA-C jsou jediné polymorfní HLA molekuly I. třídy na povrchu trofoblastů, vysoce polymorfní HLA-A a HLA-B se zde nenacházejí (Apps *et al.*, 2009). Skupina KIR má buď inhibiční (KIR A) nebo aktivační (KIR B) funkci. Homozygotní forma KIR AA (pouze inhibiční receptory) v kombinaci s alotypem HLA-C2 plodu přináší vyšší riziko rozvoje preeklampsie (Hiby *et al.*, 2010).

Molekuly HLA-G patří mezi neklasické molekuly HLA I. třídy a jejich exprese je omezená na buňky extravilózního trofoblastu, oocyty, embryonální buňky, brzlík a

aktivované monocyty (Jurisicova *et al.*, 1996; Moreau *et al.*, 1999). HLA-G se vyskytují také ve zkrácené variantě jako sekretované molekuly. Díky specifické expresi začala být zkoumána jejich role během placentace a těhotenství. HLA-G molekuly by mohly mít ochranný vliv neboť inhibují NK buňky a chrání před cytotoxickým působením T-buněk (Chumbley *et al.*, 1994). Sekretovaná forma HLA-G by mohla bránit maternální imunitní odpovědi. U pacientek s preeklampií byla pozorována nižší genová exprese HLA-G molekul a jejich snížené množství v mateřské cirkulaci (Yie *et al.*, 2004).

4.2.4 Dědičnost a kandidátní geny

Dědičnost preeklampsie je prozatím neznámá. Většina případů se objevuje de novo, bez předchozího výskytu v rodině. Přítomnost PE u příbuzné prvního stupně však zvyšuje riziko vážné PE až čtyřikrát (Carr *et al.*, 2005). Téměř dvojnásobné riziko výskytu PE je udáváno v případě, že současný partner měl v předchozím vztahu s jinou ženou potomky a těhotenství bylo komplikováno přítomností PE (Lie *et al.*, 1998). Tyto dvě studie naznačují silný paternální vliv.

V rodinách s familiárním výskytem preeklampsie byly provedeny studie polymorfismů ve vytipovaných oblastech genomu. Identifikovány byly dva kandidátní geny. Gen *ACVR2A* kóduje receptor pro signální protein Aktivin A. Lokalizován je v oblasti 2q22. Aktivin A hraje důležitou roli v diferenciaci a invazi trofoblastu a u pacientek s PE se nachází v krevním séru ve zvýšeném množství (Giguère *et al.*, 2010). Gen byl studován u australské a novozélandské populace (Moses *et al.*, 2000) a také u norské populace (Roten *et al.*, 2009). Tři nové polymorfismy byly objeveny v další studii u australské a novozélandské populace, nicméně po korekci statistických výsledků nebyla frekvence polymorfismů u pacientek s PE oproti kontrolní skupině statisticky signifikantní (Fitzpatrick *et al.*, 2009). V holandské populaci byly studovány polymorfismy v oblasti 10q22, kde se nachází gen pro transkripční faktor *STOX1* (Storkhead box-1). U pacientek s PE byl identifikován polymorfismus *Y153H*, aminokyselina na 153. místě je histidin místo tyrosinu (Lachmeijer *et al.*, 2001). V roce 2010 byla publikována studie, ve které byly znovu zkoumány polymorfismy a genová exprese *STOX1* u pacientek s PE a FGR (Fenstad *et al.*, 2010). Odlišná genová exprese ani výskyt polymorfismů nebyl prokázán, ale byla objevena nižší exprese genu *STOX2* (paralog *STOX1*) v oblasti deciduy. Vyšší genová exprese u pacientek s PE byla nalezena u leptinu, laeverinu, β -HCG, endoglinu a *FLT1* (Sitrás *et al.*, 2009).

4.3 Fetální růstová retardace

Normální růst plodu je kombinací faktorů maternálních, fetálních a placentárních (Gardosi *et al.*, 1992). Fetální nebo intrauterinní růstová retardace je podle sdružení amerických gynekologů a porodníků ACOG (Gynecologists ACoOa., 2013) stav, kdy plod neuplatní naplno svůj růstový potenciál. V souvislosti s nedostatečnou velikostí plodu nebo jeho nízkou hmotností se objevují tři odlišné diagnózy: nízká porodní hmotnost (LBW – low birth weight), intrauterinní růstová retardace (IUGR) a konstitučně malí novorozenci nebo plody (SGA, small to gestational age).

Nízká porodní hmotnost je podle Světové zdravotnické organizace (WHO) definována jako hmotnost novorozence < 2500 g a nijak nezohledňuje gestační věk jedince (WHO, 2010). Do této kategorie jsou zařazeni i zdraví novorozenci, kteří se narodili předčasně. Jejich nízká hmotnost je důsledkem kratšího intrauterinního vývoje a odpovídá danému gestačnímu stáří. Novorozenci s hmotností pod 2500 g mají dvacetkrát vyšší riziko úmrtí než novorozenci s porodní váhou nad 2500 g. Ročně se narodí přibližně 20 milionů dětí s nízkou porodní hmotností (15 % všech novorozenců), téměř polovina z nich připadá na region jihovýchodní Asie (Wardlaw, 2004).

Do kategorie nízké porodní hmotnosti mohou a nemusí spadat další dvě diagnózy – SGA a IUGR.

4.3.1 Konstitučně malí novorozenci / plody (SGA)

SGA plody a novorozenci jsou diagnostikováni na základě tělesné hmotnosti, která se pohybuje pod 10. percentilem pro dané gestační stáří. Jedná se o konstitučně malé plody a jejich prognóza je lepší než plodů s IUGR.

Rizikovým faktorem pro rozvoj SGA je výskyt hypertenze u matky. Při hodnotách krevního tlaku nad 140/90 mmHg se riziko rozvoje SGA pohybuje mezi 8 až 15 %. Při závažnější hypertenzi s hodnotami krevního tlaku nad 180/110 mmHg se incidence SGA pohybuje okolo 40 % (Sibai *et al.*, 2002). Onemocnění ledvin přináší vyšší riziko rozvoje hypertenze, preeklampsie i růstové retardace u těhotných žen. Závažné poškození ledvin, které je diagnostikováno na základě koncentrace kreatininu v krevním séru (> 220 $\mu\text{m/l}$), je spojené s 37% výskytem SGA (Jones *et al.*, 1996).

Odlišit konstitučně malé plody od plodů s růstovou retardací vyžaduje detailní ultrazvukové vyšetření zahrnující měření biometrických parametrů plodu, množství

amniové tekutiny, detekci strukturních anatomických abnormalit a dopplerovské měření průtoku ve vybraných cévách. Pokud hodnoty dopplerovského vyšetření a množství amniové tekutiny odpovídají fyziologickému průběhu těhotenství a zároveň není pozorována změna růstové rychlosti (v odstupu alespoň dvou týdnů), pak lze plod označit za konstitučně malý (Breeze a Lees, 2007). Definitivní stanovení diagnózy záleží na individuálním posouzení. Diagnóza SGA může být stanovena i v případě výskytu zpětného toku krve v diastole, který je považován za abnormální nález dopplerovského vyšetření průtoku cév (Schreuder *et al.*, 2002).

4.3.2 Intrauterinní růstová retardace (IUGR)

Intrauterinní růstová retardace je stav, kdy plod neuplatní naplno svůj růstový potenciál. Růstové období plodu lze rozdělit na tři fáze: 1) hyperplazie buněk – do 16. týdne gravidity, 2) kombinace hyperplazie a hypertrofie – od 16. týdne do třetího trimestru, 3) hypertrofie buněk – od poloviny třetího trimestru až do porodu (Baschat, 2006). Prevalence IUGR v populaci je okolo 8 %. V případě porodů mrtvého dítěte je IUGR přítomný v 52 % (Froen *et al.*, 2004). Existují dvě formy růstové retardace:

- Asymetrická forma IUGR – častější případ IUGR, hlava plodu vykazuje normální velikost a vzhledem k tělu je podstatně větší. V tomto případě se u plodu uplatňují mechanismy, které zabezpečují vývoj centrální nervové soustavy, růst těla je na úkor růstu mozku zpomalen (Chavez *et al.*, 2007). Zpravidla se objevuje po 20. týdnu těhotenství.
- Symetrická forma IUGR – méně častý případ IUGR. Celé tělo plodu vykazuje symetrické zpomalení růstu. Objevuje se již v raných fázích těhotenství a často je genetického původu. Z hlediska rozvoje centrální nervové soustavy je horší než asymetrická forma.

V 80 až 90 % je příčinou růstové retardace plodu nedostatečný přísun živin a kyslíku přes placentu (Bauer *et al.*, 2003). Nedostatečný přísun může být způsoben faktory maternálními, fetálními i placentárními.

Maternální příčiny:

- Genetické faktory.
- Nutriční faktory – nízká hmotnost matky, malý váhový přírůstek během těhotenství, podvýživa (Ong *et al.*, 2002).

- Zdravotní stav matky – hypoxické stavy (závažná onemocnění plic, anémie), onemocnění ledvin, chronická hypertenze, preeklampsie, diabetes mellitus I. typu, systémový lupus erythematosus (Cervera *et al.*, 2002).
- Užívání návykových látek.
- Předchozí výskyt těhotenských komplikací – potrat nebo porod mrtvého plodu, předčasný porod, IUGR v předchozím těhotenství (Breeze a Lees, 2007).

Fetální příčiny (Baschat, 2006):

- Chromozomální abnormality – trisomie autosomů (Patauův syndrom, Edwardsův syndrom, Downův syndrom), Turnerův syndrom, strukturní chromozomální aberace, genetická mozaika.
- Vrozené vývojové vady – anencefalie, ageneze a dysplazie vnitřních orgánů, omfalokéla, gastroschizis.
- Vícečetné těhotenství – monochoriální dvojčata, fetofetální transfuze, disproporcionální dvojčata nebo trojčata.
- Intrauterinní infekce.

Placentární příčiny (Baschat, 2006):

- Abnormální invaze trofoblastu
- Placentární infarkty
- Anomálie cévního řečiště v pupečníku a placentě (např. jediná umbilikální arterie)
- Chronický zánět

Prozatím nebyly identifikovány spolehlivé biochemické ukazatele, které by dokázaly odhalit u těhotných žen riziko rozvoje IUGR. Nejlepší výsledky vykazovala kombinace screeningu hladin proteinu PAPP-A (pregnancy associated plasma protein A) v prvním trimestru těhotenství a dopplerovské vyšetření průtoku cév ve druhém trimestru, konkrétně vyšetření arteria uterina. Sensitivita testu byla 62,1 % pro rozvoj preeklampsie a pouze 16 % pro porodní váhu pod 5. percentilem (Spencer *et al.*, 2005). Predikce nízké porodní váhy byla úspěšnější v případě kombinace obou vyšetření v prvním trimestru, konkrétně v 11. až 14. týdnu gravidity. Nízká porodní váha pod 10. percentilem byla úspěšně předpovězena v 34 % případů.

Důležitým krokem v diagnostice je správné určení gestačního věku plodu. Gestační stáří se určuje na základě ultrazvukového vyšetření. V rané fázi těhotenství lze změřit temenokostrční délku (CRL = crown rump length) a rozměry dělohy. Na konci druhého

trimestru a během třetího trimestru se měří následující parametry: biparietální šířka hlavy (BPD = biparietal diameter), obvod hlavy (HC = head circumference), obvod břicha (AC = abdominal circumference), délka stehenní kosti (FL = femur length). Dobrou korelaci s hmotností plodu vykazuje obvod břicha (Smith *et al.*, 1997). V případech, kdy není možné určit gestační stáří plodu, lze využít naměřené parametry ve formě indexů. První popsáný byl poměr HC/AC, který se u 60 % případů IUGR pohybuje okolo 90. percentilu pro dané gestační stáří (Campbell a Thoms, 1977). Nezávislý na stáří plodu je poměr FL/AC, který charakterizuje tělesnou stavbu plodu (Hadlock *et al.*, 1983).

V současné době je nejinformativnějším vyšetřením provedení tzv. ultrazvukové flowmetrie (dopplerovský ultrazvuk). Měření průtoku krve se provádí nejčastěji v *arteria umbilicalis*, *arteria cerebri media*, *arteria uterina* a *ductus venosus*.

Nedostatečná funkce placenty v případě růstové retardace i preeklampsie je způsobena abnormální invazí trofoblastu a nedostatečnou přeměnou děložních spirálních arterií. Spirální arterie v nezměněné podobě jsou užší a způsobují zvýšení odporu v krevním řečišti placenty. Krevní tok je za normálních okolností charakterizován křivkou, která má vrchol v momentě systoly a následně po celou diastolu mírně klesá. Proudění krve na konci diastoly je označováno jako pozitivní diastolický tok. Poškození nebo nedostatečná funkce placenty se projeví na rychlosti průtoku krve na konci diastoly jako snížená rychlost. V těžkých případech dochází ke zpětnému toku krve na konci diastoly (Wang *et al.*, 2009). Změny v průtoku krve v *a. umbilicalis* korelují s fetální hypoxemií a acidózou (Nicolaidis *et al.*, 1988).

Fetální adaptací na hypoxii je přesměrování toku krve k životně důležitým orgánům tak, aby bylo zajištěno jejich dostatečné okysličení. Vyšetřením krevního toku v *arteria cerebri media* u plodů s IUGR lze prokázat zvýšený průtok krve, který je umožněn snížením odporu v *a. cerebri media*.

4.4 Dopplerovská flowmetrie v diagnostice těhotenských komplikací

Měření průtoku krve pomocí ultrazvuku (tzv. ultrazvuková flowmetrie) je jednou z diagnostických metod, které ovlivňují rozhodování lékařů o dalším osudu těhotenství. Metoda využívá Dopplerova jevu - dochází ke změně frekvence vlnové energie odražené pohybujícím se reflektorem (v případě krve jsou to krvinky v krevním řečišti). Křivka rychlosti arteriálního toku krve přináší informaci o odporu toku krve periferně od místa měření. Tvar křivky závisí na odporu, viskozitě krve, krevním tlaku a elasticitě cév.

V případě nízkého odporu pokračuje tok krve během celého srdečního cyklu i v průběhu diastoly, jedná se o tzv. pozitivní diastolickou rychlost. Ta je typická pro pupečnickovou arterii (*arteria umbilicalis*) a většinu arterií plodu včetně mozkových arterií u normálně probíhajícího těhotenství (Wang *et al.*, 2009).

V klinické praxi se sledují zejména průtoky v *arteria umbilicalis* a *arteria cerebri media*. Stanovuje se pulzatilní index (PI) – vypočítá se jako rozdíl maximální systolické rychlosti a rychlosti na konci diastoly vydělený střední rychlostí průtoku. Pro *a. umbilicalis* platí, že pozitivní diastolický tok je přítomen od 13. týdne těhotenství, ve 20. týdnu nabývá PI průměrné hodnoty 1,3 a plynule klesá až do porodu, kdy se průměrná hodnota pohybuje okolo 0,8 (Parra-Cordero *et al.*, 2007). Hodnota PI v *a. cerebri media* od 20. týdne gravidity (PI = 1,6) roste až do 32. týdne (PI = 2,2) a poté klesá až do porodu (Ebbing *et al.*, 2007).

Kromě pulzatilního indexu se stanovuje ještě index cerebroplacentární (CPI; CP ratio), vypočítá se jako poměr hodnot PI v *a. cerebri media* a v PI v *a. umbilicalis*. Průměrné hodnoty CPI rostou od 1,4 ve 20. týdnu až na 2,4 ve 33. týdnu a poté klesají až do porodu (Ebbing *et al.*, 2007). Nízká hodnota CPR ukazuje na redistribuci krve v oběhu směrem k mozku (centralizace oběhu) a zdá se být přesnějším ukazatelem než samotné hodnoty PI v *a. umbilicalis* nebo PI v *a. cerebri media* (Gramellini *et al.*, 1992).

5. Vybrané miRNA pro studium těhotenských komplikací

V diplomové práci navazuji na předchozí výzkumy, které proběhly v naší laboratoři (Kotlabová *et al.*, 2011; Hromadníková *et al.*, 2012). Analyzovala jsem sedm vybraných placentárně specifických miRNA (Tab. 3), které splňovaly následující kritéria:

- i. detekce v placentě s úspěšností 100 %,
- ii. detekce v plazmě v průběhu celého těhotenství s úspěšností ≥ 67 % (pozitivní amplifikace alespoň ve čtyřech jamkách ze šesti),
- iii. detekce je možná pouze u těhotných žen.

Tabulka č. 3 Sekvence a tkáňová specifita vybraných miRNA

Sekvence a tkáňová specifita vybraných miRNA			
MikroRNA	Tkáňová specifita	Sekvence mikroRNA	Důvod pro zařazení do studie
hsa-miR-16	všudypřítomná	5'-UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG-3'	endogenní kontrola
hsa-let-7d	všudypřítomná	5'- AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU -3'	endogenní kontrola
syn-cel-miR-39	-	5'- UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG -3'	minimalizace fluktuace experimentálních dat
hsa-miR-516-5p	placenta	5'-CAUCUGGAGGUAAGAAGCACUUU-3'	diagnostický potenciál
hsa-miR-517*	placenta	5'-CCUCUAGAUGGAAGCACUGUCU-3'	diagnostický potenciál
hsa-miR-518b	placenta	5'- CAAAGCGCUCCCCUUUAGAGGU -3'	diagnostický potenciál
hsa-miR-520a*	placenta	5'- CUCCAGAGGGAAGUACUUUCU -3'	diagnostický potenciál
hsa-miR-520h	placenta	5'- ACAAAGUGCUUCCCUUUAGAGU -3'	diagnostický potenciál
hsa-miR-525	placenta	5'- CUCCAGAGGGAUGCACUUUCU -3'	diagnostický potenciál
hsa-miR-526a	placenta	5'- CUCUAGAGGGAAGCACUUUCU -3'	diagnostický potenciál

Další dvě miRNA byly do studie zařazeny jako endogenní kontroly (miR-16, let-7d). Syntetická cel-miR-39 byla zařazena z důvodu minimalizace fluktuace experimentálních dat.

6. Cíle práce

Hlavním cílem mé práce bylo stanovit, jestli by se vybrané placentárně specifické miRNA mohly uplatňovat v patogenezi těhotenských komplikací; konkrétně u preeklampsie, fetální růstové retardace a gestační hypertenze. Dílčími cíli práce byly následující úkoly:

- porovnat koncentraci a genovou expresi extracelulárních miRNA u pacientek s fyziologickým průběhem těhotenství a u pacientek s těhotenskými komplikacemi,
- zhodnotit diagnostický potenciál vybraných miRNA,
- určit, zda má hladina miRNA v mateřské cirkulaci vliv na závažnost onemocnění,
- určit, zda se předchozí výskyt hypertenze v osobní anamnéze těhotné ženy projeví na hladinách miRNA,
- porovnat hladiny miRNA v plazmě s parametry z ultrazvukového vyšetření krevního oběhu plodu a placenty.

Dalším cílem mé práce bylo určit, zda mají vybrané placentárně specifické miRNA potenciál predikovat pozdější výskyt těhotenských komplikací. V tomto případě jsem byla zapojena do dlouhodobé prospektivní studie.

Extracelulární miRNA byly izolovány z krevní plazmy těhotných žen. Celkem jsem testovala sedm vybraných placentárně specifických miRNA (miR-516-5p, miR-517*, miR-518b, miR-520a*, miR-520h, miR-525, miR-526a) a dvě další miRNA jako endogenní kontroly (miR-16 a let-7d). K izolaci miRNA jsem používala mirVana Isolation Kit, detekci a kvantifikaci jsem prováděla pomocí kvantitativní PCR v reálném čase.

7. Materiál

Materiálem pro výzkum byly vzorky získané z odběru periferní žilní krve matky a placentární tkáň z fetální části placenty získaná od jedné náhodně vybrané pacientky s fyziologickým průběhem gravidity, která sloužila jako referenční vzorek pro kvantifikaci miRNA. Vzorky krve pacientek s fyziologickou graviditou poskytla Fakultní nemocnice v Motole, patologické vzorky jsme získali převážně od pacientek Ústavu péče o matku a dítě v Praze. Ze studie byly vyloučeny všechny ženy s vícečetným těhotenstvím a pacientky po umělém oplodnění. Všechny pacientky poskytly informovaný souhlas s účastí na výzkumu.

V první části jsem zpracovala dohromady 168 krevních vzorků. U 63 pacientek byla diagnostikována preeklampsie s nebo bez fetální růstové restrikce (PE \pm FGR), u 27 pacientek byla diagnostikována fetální růstová retardace (FGR), 23 pacientek mělo diagnostikováno hypertenzi a 55 vzorků s fyziologickým průběhem gravidity sloužilo jako kontrola (Tab. 4). V případě, že se u některé pacientky vyskytlo více diagnóz současně, byla zařazena do skupiny vážnějšího onemocnění. Pacientkám byla krev odebrána v momentě klinické manifestace onemocnění. Kontrolní vzorky, které tvořila skupina žen s fyziologickým průběhem gravidity, byly odebrány vždy v 36. týdnu těhotenství.

Tabulka č. 4 Počet zpracovaných vzorků a zastoupení jednotlivých diagnóz v rámci těhotenských komplikací

Počet zpracovaných vzorků	
Diagnóza	Počet pacientek
Preeklampsie (PE) \pm FGR	63
Hypertenze	23
Fetální růstová retardace (FGR)	27
Fyziologická gravidita (FG)	55
Celkem	168

Fyziologická gravidita byla definována jako gravidita bez komplikací, s porodem po 37. gestačním týdnu a s hmotností novorozence > 2500 g.

Pacientky s PE splňovaly následující diagnostická kritéria: hladina krevního tlaku vyšší než 140/90 ve dvou měřeních s šestihodinovým odstupem a současně proteinurie > 300 mg/ 24 hodin, manifestované po 20. týdnu těhotenství. Rozdělení na závažnou

(severe) a mírnou (mild) preeklampsii bylo provedeno podle kritérií ACOG (Bulletins--Obstetrics ACoP., 2002); pacientek se závažnou formou PE bylo 39, mírnou formu PE mělo 24 pacientek. U 18 pacientek byla před výskytem PE diagnostikována některá z forem hypertenze (gestační nebo esenciální), jednalo se o tzv. preeklampsii superponovanou na předchozí hypertenzi. U zbylých 45 pacientek se PE objevila bez předchozího výskytu hypertenze. Závažnost všech výše uvedených onemocnění se rovněž hodnotí podle doby klinické manifestace onemocnění (před nebo po 34. týdnu gravidity). Stav 24 pacientek s PE vyžadoval ukončení gravidity před 34. týdnem gestace, 39 pacientek rodilo po 34. týdnu gravidity (Tab. 5).

Tabulka č. 5 Charakteristika skupiny pacientek s preeklampsii

Pacientky s preeklampsii (PE)	Počet
Forma onemocnění	
mírná PE	24
závažná PE	39
Předchozí výskyt hypertenze	
PE nasedající na hypertenzi	18
PE bez předchozího výskytu hypertenze	45
Stáří novorozence	
porod před 34. týdnem gravidity	24
porod po 34. týdnu gravidity	39

Skupina pacientek s hypertenzí zahrnuje pacientky s primární nebo sekundární hypertenzí (esenciální hypertenze, EH) a hypertenzí gestační (GH), která v dané skupině dominovala. Gestační hypertenze byla definována jako zvýšený krevní tlak diagnostikovaný po 20. týdnu těhotenství, který nedoprovázela proteinurie.

Do skupiny fetální růstové restrikce (FGR) jsem zařadila plody s intrauterinní růstovou retardací (IUGR) a plody/novorozence malé vzhledem ke gestačnímu stáří (SGA). Obě skupiny jsou definovány nízkou hmotností, která se pohybuje pod 10. percentilem v dané populaci pro dané gestační stáří. V 7 případech byla diagnóza FGR doprovázena sníženým množstvím plodové vody – oligohydramnion nebo anhydramnion (Tab. 6).

Tabulka č. 6 Charakteristika skupiny pacientek s fetální růstovou retardací

Pacientky s fetální růstovou retardací	Počet
Období klinické manifestace	
porod před 34. týdnem gravidity	8
porod po 34. týdnu gravidity	19
Množství plodové vody	
normální množství	20
anhydramnion nebo oligohydramnion	7

Jedním z důležitých diagnostických vyšetření těhotenských komplikací je vyšetření průtoku cév tzv. ultrazvuková (dopplerovská) flowmetrie. Klinická data z ultrazvukového vyšetření jsem získala pouze od některých pacientek s těhotenskými komplikacemi. Celkem byly sledovány tři parametry: pulzatilní index v *arteria umbilicalis* (PI AU), pulzatilní index v *arteria cerebri media* (PI MCA), cerebroplacentární index (CPI).

Průtok v *a. umbilicalis* byl změřen u 87 pacientek, rozložení diagnóz bylo následující: 3 EH, 24 FGR, 13 GH, 37 PE, 10 PE + FGR. Patologická hodnota PI se objevila u 28 pacientek, konkrétně u 14 případů s FGR, 6 případů s PE a 8 případů s PE + FGR (Tab. 7).

Průtoky v *a. cerebri media* jsem získala od 51 pacientek, rozložení diagnóz bylo následující: 22 FGR, 18 PE, 11 PE + FGR. Patologická hodnota PI se objevila u 21 pacientek, konkrétně u 11 případů s FGR, 5 případů s PE a 5 případů s PE + FGR (Tab. 7).

Tabulka č. 7 Počet vyšetřených pacientek metodou dopplerovské flowmetrie – *arteria umbilicalis* a *arteria cerebri media*

Počet vyšetřených pacientek metodou dopplerovské flowmetrie				
Diagnóza	PI v <i>arteria umbilicalis</i>		PI v <i>arteria cerebri media</i>	
	počet vyšetřených pacientek	počet pacientek s patologickou hodnotou	počet vyšetřených pacientek	počet pacientek s patologickou hodnotou
PE	37	6	18	5
PE + FGR	10	8	11	5
FGR	24	14	22	11
GH	13	0	0	-
EH	3	0	0	-
Celkem	87	28	51	21

Hodnotu CPI jsem získala od 50 pacientek, rozložení diagnóz bylo následující: 22 FGR, 17 PE, 11 PE + FGR. Patologický CPI se objevil u 21 pacientek, konkrétně u 12 případů s FGR, 3 případů s PE a 6 případů s PE + FGR (Tab. 8).

Tabulka č. 8 Počet vyšetřených pacientek metodou dopplerovské flowmetrie – cerebroplacentární index

Počet vyšetřených pacientek metodou dopplerovské flowmetrie – cerebroplacentární index		
Diagnóza	počet vyšetřených pacientek	počet pacientek s patologickou hodnotou
PE	17	3
PE + FGR	11	6
FGR	22	12
GH	0	-
EH	0	-
Celkem	50	21

Ve druhé části práce jsem se zaměřila na potenciál vybraných miRNA predikovat pozdější výskyt uvedených těhotenských komplikací. V prospektivní části studie jsem zpracovala celkem 58 krevních vzorků fyziologických gravidit z 12., 16. a 25. týdne těhotenství od 21 pacientek. Záměrně byly vybrány pouze ty pacientky, které byly do studie zařazeny hned na začátku těhotenství a každá tak poskytla tři až čtyři vzorky krve ve sledovaných týdnech gravidity (12., 16., 25. a 36. týden; vzorky z 36. týdne jsem použila rovněž jako kontrolu v první části práce).

Zpracovala jsem také 20 vzorků od 13 pacientek s rizikem rozvoje PE na základě anamnestických údajů. Všem 13 pacientkám byla krev odebrána mezi 12. až 14. týdnem těhotenství, u 7 pacientek jsme měli k dispozici také odběr z 24. nebo 25. týdne těhotenství. Všech 20 vzorků bylo získáno v době, kdy se u pacientek ještě neobjevily žádné příznaky onemocnění. Počet zpracovaných vzorků je uveden v tabulce č. 9.

Tabulka č. 9 Počet zpracovaných vzorků do prospektivní části studie

Počet zpracovaných vzorků do prospektivní části studie		
	Týden těhotenství	Počet vzorků
Fyziologická gravidita	12	21
	16	17
	25	20
Celkem		58
Pacientky s rizikem rozvoje těhotenských komplikací	12 až 14	13
	24 až 25	7
Celkem		20

Zastoupení jednotlivých diagnóz bylo následující: u 8 pacientek se objevila gestační hypertenze, u 2 pacientek byla přítomna mírná forma preeklampsie nasedající na esenciální hypertenzi, 1 pacientka měla diagnostikovanou závažnou formou preeklampsie, 1 pacientce byla diagnostikována preeklampsie v kombinaci s intrauterinní růstovou retardací a 1 pacientka měla diagnostikovanou intrauterinní růstovou retardaci (Tab. 10).

Tabulka č. 10 Zastoupení jednotlivých diagnóz v prospektivní studii

Zastoupení jednotlivých diagnóz v prospektivní studii	
Diagnóza	Počet pacientek
Gestační hypertenze	8
Mírná PE nasedající na esenciální hypertenzi	2
Závažná PE	1
PE + IUGR	1
IUGR	1
Celkem	13

8. Metody

8.1 Zpracování biologického materiálu

Prvotní zpracování biologického materiálu probíhalo ihned po jeho doručení do laboratoře. Periferní žilní krev o objemu 9 ml byla odebírána do zkumavek s ethylendiamintetraoctovou kyselinou (EDTA). Krevní plazmu jsme získali stočením na centrifuze dvakrát při $1200 \times g$ po dobu 10 minut za pokojové teploty. Před dalším zpracováním byla plazma zamražena na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Placenta byla odebrána ihned po porodu a uložena do 50ml zkumavky s RNAlaterem. Promýváním v roztoku PBS a v lyzačním roztoku byla placenta zbavena krve a následně byla zamražena v RNAlateru na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8.2 Izolace RNA obohacené o krátké RNA z krevní plazmy

Celkovou RNA obohacenou o krátké RNA jsem izolovala z 1 ml plazmy, při izolaci jsem používala mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA) a postupovala jsem podle instrukcí výrobce. Plazmu jsem nechala rozmrazit při pokojové teplotě a přidala jsem k ní 3 ml Trizolu (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Poté jsem přidala 1 μl 0,1nmol syntetické cel-miR-39. Po pětiminutové inkubaci při pokojové teplotě jsem přidala 800 μl chloroformu, směs jsem důkladně protřepala a inkubovala po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Poté jsem vzorek umístila na 15 minut do chlazené centrifugy ($12000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Po stočení jsem odebrala vodnou fázi a přidala jsem 1/3 objemu 100% ethanolu. Vzorek jsem aplikovala na kolonku a stáčela po dobu 15 s při $10\,000 \times g$, díky relativně nízké koncentraci ethanolu se na filtru kolonky zachytily dlouhé molekuly RNA. Filtrát jsem přemístila do nové zkumavky a přidala jsem 2/3 objemu 100% ethanolu. Vzorek jsem aplikovala na novou kolonku a opět jsem stáčela po dobu 15 s při $10\,000 \times g$. Tentokrát se na filtru kolonky zachytily krátké molekuly RNA. Po použití promývacích roztoků a odstranění reziduální tekutiny jsem na kolonku aplikovala 100 μl elučního roztoku zahřátého na $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, který z filtru kolonky vyplavil všechny krátké molekuly RNA.

Abych minimalizovala kontaminaci DNA, ošetřila jsem eluát Dnasou I (Fermentas International, Burlington, ON, Canada) a inkubovala při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 minut. Poté jsem ke vzorku přidala EDTA (Fermentas International) a inkubovala jsem při $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut.

8.3 Izolace RNA obohacené o krátké RNA z placentární tkáně

Izolace z tkání se liší od izolace z plazmy v několika počátečních krocích. Při izolaci jsem používala rovněž mirVana miRNA Isolation kit (Ambion). Optimální množství tkáně pro izolaci je 30 až 70 mg. Tkáň jsem nechala rozmrazit, zvážila a odebrala doporučené množství. Na ledu jsem ke tkáni přidala desetinásobek lyzačního roztoku (30 mg tkáně ~ 300 μ l lyzačního roztoku), provedla jsem homogenizaci speciálním přístrojem (TissueRuptor, Qiagen), přidala jsem desetinu objemu homogenizačního roztoku (30 mg tkáně ~ 300 μ l lyzačního roztoku ~ 30 μ l homogenizačního roztoku) a 10 minut jsem směs inkubovala na ledu. V následujícím kroku jsem přidala 1 μ l 0,1nmol syntetické cel-miR-39. Poté jsem přidala Fenol:Chloroform (stejný objem jako lyzační roztok) a důkladně jsem směs promíchala na vortexu. Pro oddělení vodné a organické fáze jsem směs centrifugovala při $10\,000 \times g$ po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Odebrala jsem vodnou fázi a dál jsem pokračovala stejně jako u vzorků plazmy. Přidala jsem 1/3 objemu 100% ethanolu. Vzorek jsem aplikovala na kolonku a stáčela po dobu 15 s při $10\,000 \times g$, díky relativně nízké koncentraci ethanolu se na filtru kolonky zachytily dlouhé molekuly RNA. Filtrát jsem umístila do nové zkumavky a přidala jsem 2/3 objemu 100% ethanolu. Vzorek jsem aplikovala na novou kolonku a opět jsem stáčela po dobu 15 s při $10\,000 \times g$. Tentokrát se na filtru kolonky zachytily krátké molekuly RNA. Po použití promývacích roztoků a odstranění reziduální tekutiny jsem na kolonku aplikovala 100 μ l elučního roztoku zahřátého na 95 °C, který z filtru kolonky vyplavil všechny krátké molekuly RNA.

Abych minimalizovala kontaminaci DNA, ošetřila jsem eluát Dnasou I (Fermentas International) a inkubovala při 37 °C po dobu 30 minut. Poté jsem ke vzorku přidala EDTA (Fermentas International) a inkubovala jsem při 65 °C po dobu 10 minut.

8.4 Měření koncentrace extrahované RNA na spektrofotometru

Koncentrace a čistota extrahované RNA byla měřena na spektrofotometru (NanoDrop-1000; Witec AG, Littau, Switzerland) v ng/ μ l, čistota vzorku byla posuzována na základě absorbance při vlnových délkách 230 nm, 260 nm a 280 nm.

Vzorky izolované z plazmy nebyly před reverzní transkripcí ředěny, ředěn byl pouze vzorek placenty na koncentraci 3 ng/ μ l.

8.5 Reverzní transkripce

Každá miRNA byla přepsána v procesu reverzní transkripce do cDNA s použitím TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems, Brachburg, NJ, USA) a TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Součástí TaqMan MicroRNA Assay jsou specifické RT primery s vlásenkou (stem-loop primery). Reakční objem v jedné jamce byl 10 μ l pro kontrolní miRNA (miR-16, let-7d, syn-cel-miR-39) a 32 μ l pro placentárně specifické miRNA (miR-516-5p, miR-517*, miR-518b, miR-520a*, miR-520h, miR-525, miR-526a). Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce č. 11. Ve všech krocích byly dodržovány instrukce od výrobce.

Tabulka č. 11 Složení reakční směsi pro reverzní transkripci

Složení reakční směsi pro reverzní transkripci		
	Kontrolní miRNA	Placentárně specifické miRNA
	množství na 1 jamku (μ l)	množství na 1 jamku (μ l)
dNTPs	0,1	0,32
Reverzní transkriptáza	0,7	2,13
Pufr	1,0	3,20
Inhibitor	0,1	0,43
Voda	2,7	8,85
Primery	2,0	6,4
Vzorek	3,4	10,7
Celkový reakční objem	10	32

dNTPs = volné deoxynukleotidtrifosfáty

Reverzní transkripce probíhala za následujících teplotních podmínek: 30 minut při 16 °C, 30 minut při 42 °C, 5 minut při 85 °C a 10 minut při 4 °C. Reakce byla provedena na přístroji 7500 real-time PCR systém (Applied Biosystems). Reverzní transkripci jsem kvůli rychlé degradaci miRNA prováděla vždy ve stejný den jako izolaci.

8.6 Kvantitativní PCR v reálném čase

Po reverzní transkripci následovala amplifikace cDNA prostřednictvím kvantitativní PCR v reálném čase. Pro reakci jsem používala TaqMan Universal PCR

Master Mix (Applied Biosystems) společně se specifickými primery a TaqMan MGB sondou (TaqMan MicroRNA Assay; Applied Biosystems), po důkladném promíchání byl přidán i cDNA templát. Složení reakční směsi se liší u kontrolních a placentárně specifických miRNA. U placentárně specifických jsem přidávala 15 μ l cDNA do 20 μ l Master Mixu, u kontrolních pouze 4,4 μ l cDNA do 30,6 μ l Master Mixu. Celkový reakční objem v každé jamce byl 35 μ l.

Tabulka č. 12 Složení reakční směsi pro PCR v reálném čase pro kontrolní a placentárně specifické miRNA

Složení reakční směsi pro PCR v reálném čase		
	Kontrolní miRNA množství na 1 jamku (μ l)	Placentárně specifické miRNA množství na 1 jamku (μ l)
PCR Master Mix	30,6	20
cDNA	4,4	15
Celkový reakční objem	35	35

Všechny plazmatické vzorky byly analyzovány v duplikátech. Do každé analýzy byl rovněž zařazen referenční vzorek z kontrolní placenty a negativní kontrola (Master Mix bez cDNA templátu). Podmínky reakce byly dodržovány podle instrukcí výrobce. Prvním krokem byla preinkubace 2 minuty při 50 °C, ve druhém kroku probíhala aktivace Taq polymerázy při 95 °C po dobu 10 minut. Následovalo 50 cyklů, během kterých se střídaly teploty 95 °C po dobu 15 s a 60 °C po dobu 60 s. Při 95 °C docházelo k denaturaci dvouvláknové DNA, při 60 °C probíhala hybridizace primerů a elongace řetězce. Jediným rozdílem oproti manuálu výrobce bylo navýšení počtu cyklů na 50. Analýza byla provedena na přístroji 7500 real-time PCR systém (Applied Biosystems).

8.7 Kvantifikace extracelulárních miRNA v mateřské cirkulaci

Základem kvantifikace dat z PCR v reálném čase je hodnota Ct, která udává číslo cyklu, ve kterém hladina fluorescence překročila stanovenou prahovou hodnotu.

8.7.1 Absolutní kvantifikace

Metoda absolutní kvantifikace určuje výchozí počet kopií amplifikované sekvence. Využívá lineárního vztahu mezi logaritmem původního počtu kopií templátu a hodnotou

Ct příslušné amplifikační křivky. Výpočet výchozí koncentrace probíhá pomocí kalibrační křivky, která byla sestavena na základě diluční série vzorků o známé koncentraci. V mém případě byla kalibrační křivka vytvořena na základě čtyřnásobného ředění vzorku z fetální části placenty.

8.7.2 Relativní kvantifikace

Standardní metodou hodnocení dat z kvantitativní PCR v reálném čase je komparativní metoda $2^{-\Delta\Delta C_t}$, která porovnává expresi sledovaných genů vzhledem k tzv. *housekeeping* genu (Livak a Schmittgen, 2001). *Housekeeping* gen by se měl vyznačovat stálou expresí ve všech buňkách jedince. Pro kvantifikaci extracelulárních miRNA nebyl dosud žádný takový gen jednoznačně určen vzhledem k vysoké variabilitě exprese. Naším původním záměrem bylo normalizovat data vzhledem k všudypřítomným miR-16 a let-7d, které byly do studie zařazeny na základě referencí z předchozích studií (Heneghan *et al.*, 2010). Bohužel se v průběhu studie ukázalo, že tyto miRNA jsou nepoužitelné jako endogenní kontroly, protože jejich množství a exprese se v rámci jednotlivých skupin pacientek významně lišily.

Rozhodla jsem se proto data hodnotit metodou $2^{-\Delta C_t}$, kde ΔC_t představuje rozdíl mezi expresí miRNA v plazmě a v placentární tkáni, kterou jsem v každé analýze používala jako referenční vzorek. Placentární tkáň pocházela od jedné náhodně vybrané pacientky s fyziologickým průběhem gravidity, tudíž jsou data z různých analýz vzájemně srovnatelná. U vzorků pocházejících z plazmy jsme ještě před výpočtem $2^{-\Delta C_t}$ provedli normalizaci Ct hodnot vůči syntetické cel-miR-39. Cel-miR-39 jsme přidávali na začátku izolace vždy ve stejném množství o stejné koncentraci.

8.8 Statistická analýza

Analýzu dat jsem provedla pomocí statistického softwaru Statistica 9.0 (StatSoft, Inc., USA) a Kyplot v2.0 beta. K porovnání množství a exprese miRNA ve skupinách pacientek s různými diagnózami jsem použila test analýzy rozptylu (ANOVA). Analýza rozptylu je založena na předpokladu, že každý z výběrů pochází z populace s normálním rozdělením se stejnou směrodatnou odchylkou. Výsledek testu ukazuje, zda se střední hodnoty (průměry) navzájem liší nebo neliší. Výstupem testu jsou tři hodnoty: F hodnota (testová statistika), df (počet stupňů volnosti), p hodnota (hladina významnosti). F hodnota je podíl mezi variabilitou mezi skupinami a variabilitou uvnitř skupin. Pokud je tato hodnota nižší než 1,0, ukazuje na větší variabilitu uvnitř skupiny než mezi jednotlivými

skupinami. Test jsem prováděla na hladině významnosti 0,05. Statisticky signifikantní výsledky ANOVA testu byly podrobeny post-hoc analýze s použitím Bonferroniho testu.

Test ANOVA může být proveden jako analýza jednofaktorová nebo vícefaktorová. V případě vícefaktorových analýz zkoumáme vliv více faktorů na jednu proměnnou (např. vliv závažnosti PE a termínu porodu na expresi vybrané miRNA), používá se také označení dvojné třídění. Výsledek pak zahrnuje celkovou hodnotu F i hodnoty F1 a F2, které jsou přiřazené jednotlivým faktorům.

Vztah mezi parametry z dopplerovského vyšetření průtoků krve (PI v *arteria umbilicalis*, PI v *arteria cerebri media*, CPI) a hladinami miRNA jsem hodnotila pomocí Spearmanova korelačního koeficientu (ρ). Jedná se o neparametrický korelační koeficient, který vychází z pořadí hodnot a není ovlivněn odlehlými body. Koeficient nabývá hodnot od -1 do +1; čím více se hodnota blíží k ± 1 , tím silnější je závislost mezi veličinami. Nulová hodnota ukazuje na vzájemnou nezávislost. Test jsem prováděla na hladině významnosti 0,05.

9. Výsledky

V úvodní části práce jsem hodnotila rozdíly v množství a genové expresi miRNA u pacientek s těhotenskými komplikacemi v momentě klinické manifestace onemocnění v porovnání se skupinou pacientek s fyziologickým průběhem gravidity. Všechny statistické analýzy byly prováděny pro absolutní i relativní kvantifikaci miRNA. Těhotenské komplikace zahrnovaly čistou preeklampsii i preeklampsii v kombinaci s fetální růstovou retardací, fetální růstovou retardací a gestační hypertenzí. Pacientky s esenciální hypertenzí (celkem 4) byly ze statistického zpracování vyřazeny, protože hypertenze u nich není vyvolána průběhem těhotenství. Podrobná charakteristika skupiny patologií včetně počtu jednotlivých vzorků je uvedena v předchozí kapitole.

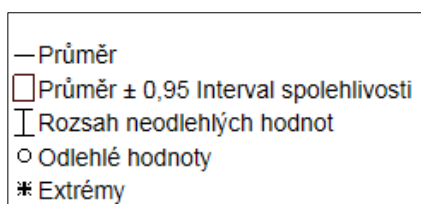
9.1 Koncentrace a genová exprese extracelulárních mikroRNA u pacientek s těhotenskými komplikacemi

Skupina pacientek s těhotenskými komplikacemi zahrnovala 109 vzorků, porovnávala byla vzhledem k 55 pacientkám s fyziologickým průběhem gravidity. Jednotlivé diagnózy nebyly v rámci tohoto hodnocení rozlišovány.

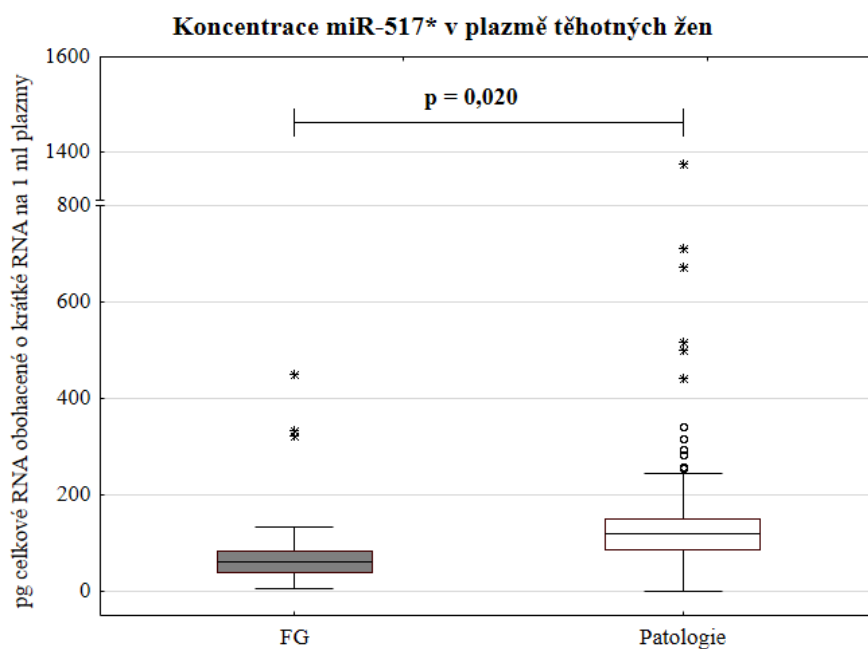
a) Absolutní kvantifikace

Rozdíly v množství miRNA mezi dvěma definovanými skupinami se neprokázaly u následujících miRNA: miR-16 ($F = 1,6200$; $df\ 1,162$; $p = 0,205$), let-7d ($F = 0,0815$; $df\ 1,162$; $p = 0,776$), miR-516-5p ($F = 3,8963$; $df\ 1,162$; $p = 0,050$), miR-520h ($F = 1,5243$; $df\ 1,162$; $p = 0,219$). Naopak statisticky významný rozdíl v množství miRNA se objevil v případě **miR-517*** ($F = 5,4831$; $df\ 1,162$; $p = 0,020$), **miR-518b** ($F = 4,5348$; $df\ 1,162$; $p = 0,035$), **miR-520a*** ($F = 5,9963$; $df\ 1,162$; $p = 0,015$), **miR-525** ($F = 7,8375$; $df\ 1,162$; $p = 0,006$), **miR-526a** ($F = 4,6261$; $df\ 1,162$; $p = 0,033$). Všechny tyto miRNA se v plazmě pacientek s těhotenskou komplikací nacházely ve vyšším množství než u pacientek s fyziologickým průběhem gravidity. Výsledky testu ANOVA včetně síly testu a 95% intervalu spolehlivosti jsou uvedeny v příloze v tabulce P1. Grafické znázornění statisticky signifikantních výsledků je zobrazeno v grafech č. 1 až 5.

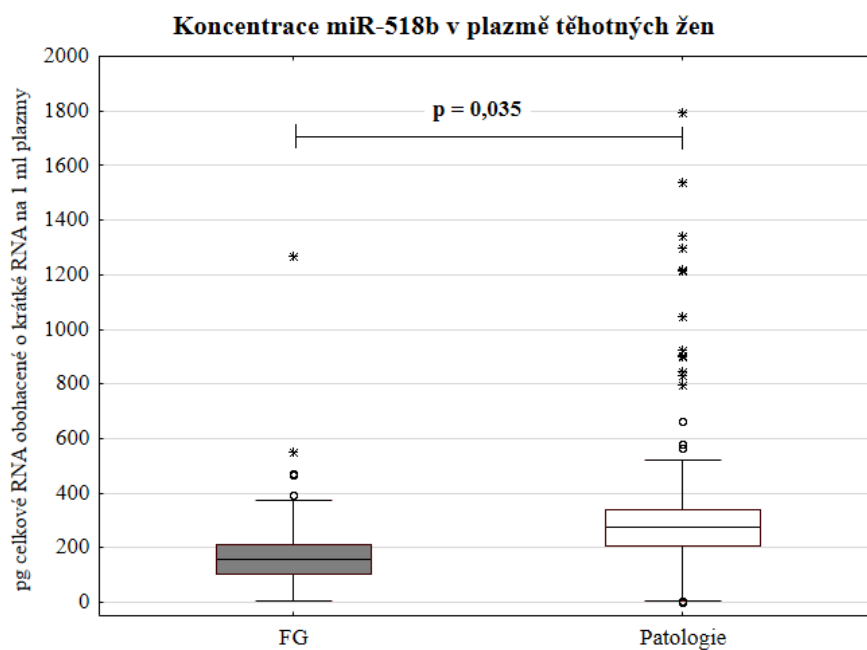
Legenda ke grafům č. 1 až 5



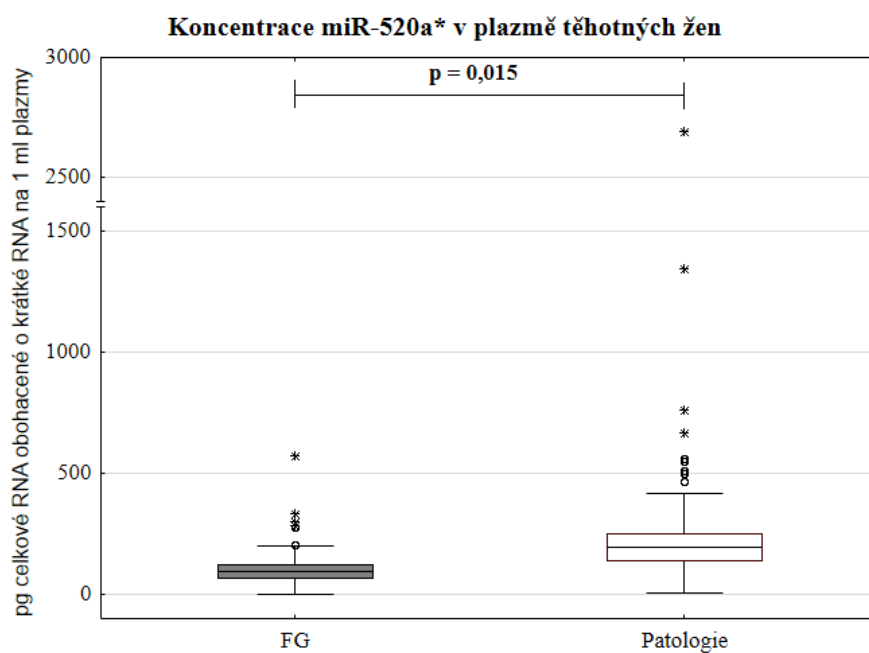
Graf č. 1 Koncentrace miR-517* v plazmě těhotných žen



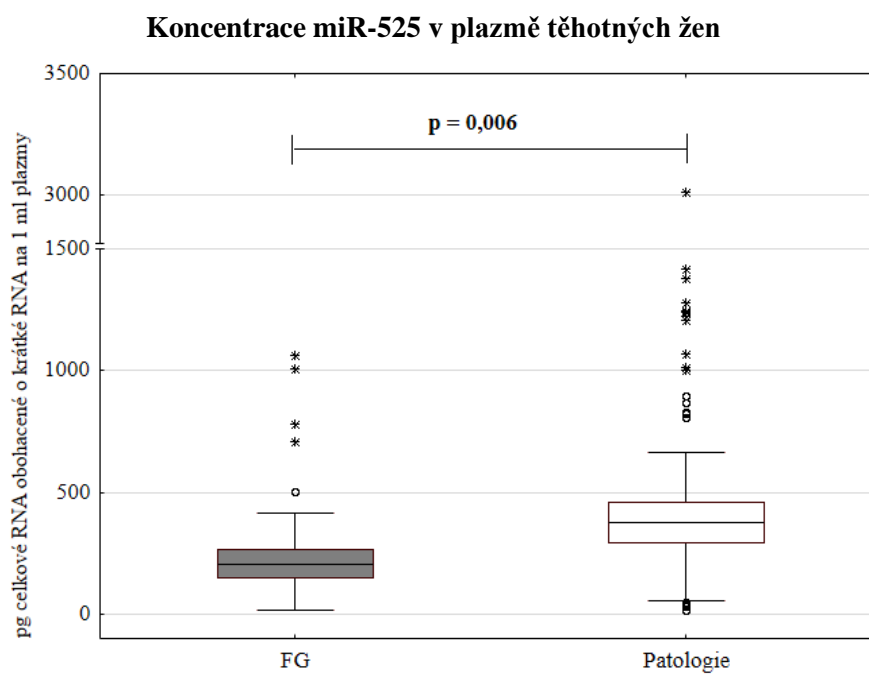
Graf č. 2 Koncentrace miR-518b v plazmě těhotných žen



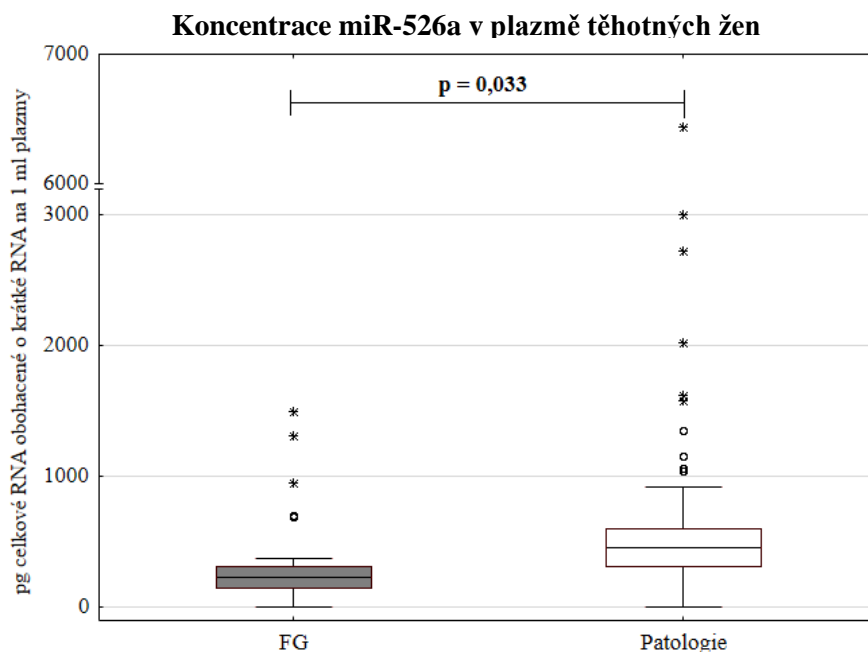
Graf č. 3 Koncentrace miR-520a* v plazmě těhotných žen



Graf č. 4 Koncentrace miR-525 v plazmě těhotných žen



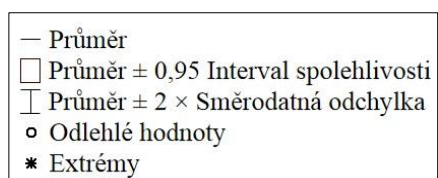
Graf č. 5 Koncentrace miR-526a v plazmě těhotných žen



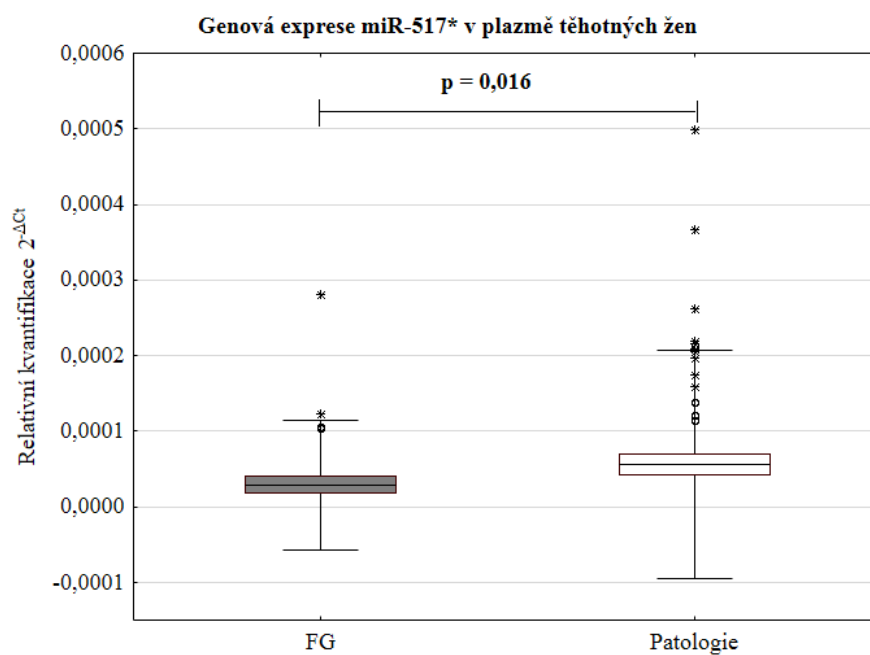
b) Relativní kvantifikace

Stejně jako v případě absolutní kvantifikace jsem porovnávala dvě skupiny pacientek. První skupinu tvořilo 109 pacientek s těhotenskými komplikacemi, druhou skupinu 55 pacientek s fyziologickým průběhem gravidity. Genová exprese extracelulárních miRNA se nelišila u následujících miRNA: miR-16 ($F = 1,2234$; df 1,162; $p = 0,270$), let-7d ($F = 0,0150$; df 1,162; $p = 0,903$), miR-516-5p ($F = 3,0695$; df 1,162; $p = 0,082$), miR-518b ($F = 2,4769$; df 1,162; $p = 0,118$), miR-520h ($F = 0,9823$; df 1,162; $p = 0,323$), miR-526a ($F = 3,3703$; df 1,162; $p = 0,068$). Statisticky významná vyšší genová exprese miRNA se v případě pacientek s těhotenskými komplikacemi objevila u **miR-517*** ($F = 5,8996$; df 1,162; $p = 0,016$), **miR-520a*** ($F = 6,5141$; df 1,162; $p = 0,012$), **miR-525** ($F = 7,1426$; df 1,162; $p = 0,008$). Výsledky testu ANOVA včetně síly testu a 95% intervalu spolehlivosti jsou uvedeny v příloze v tabulce P2. Grafické znázornění statisticky signifikantních výsledků je zobrazeno v grafech č. 6, 7 a 8.

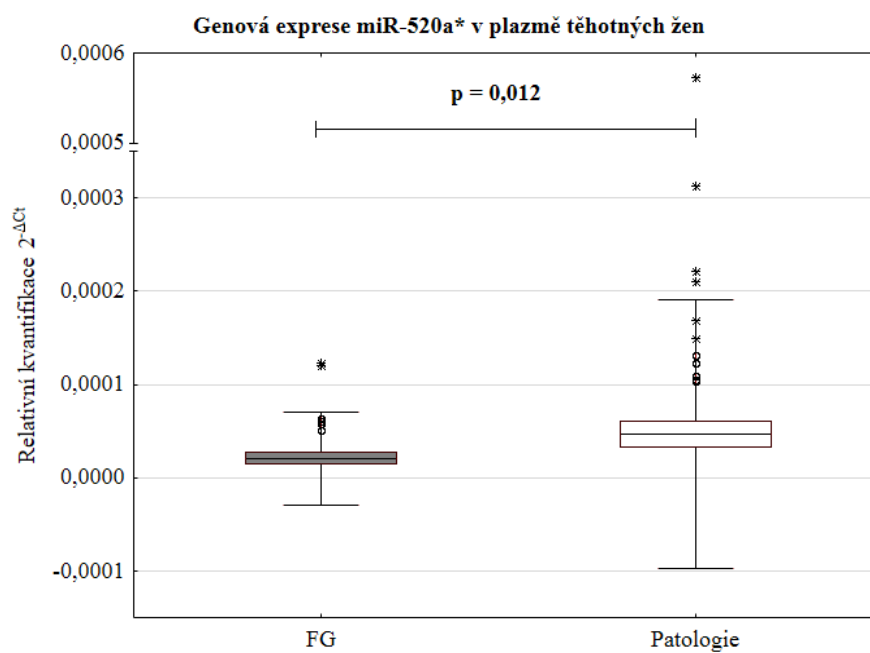
Legenda ke grafům č. 6, 7 a 8



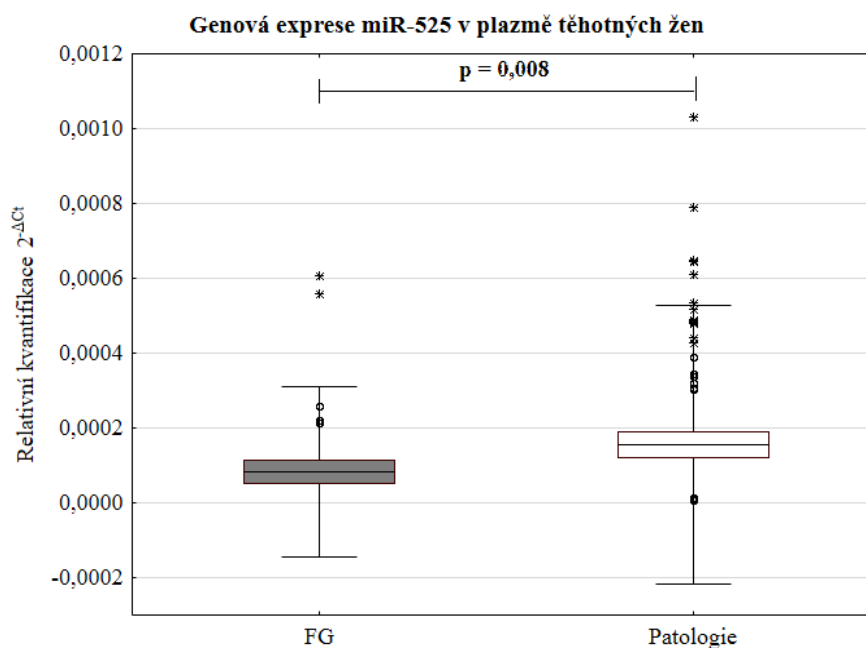
Graf č. 6 Genová exprese miR-517* v plazmě těhotných žen



Graf č. 7 Genová exprese miR-520a* v plazmě těhotných žen



Graf č. 8 Genová exprese miR-525 v plazmě těhotných žen



9.2 Koncentrace a genová exprese extracelulárních mikroRNA u pacientek s těhotenskými komplikacemi – rozdělení podle diagnóz

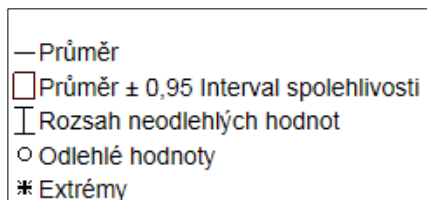
V následujícím kroku jsem pacientky rozřídila podle diagnóz. Do skupiny pacientek s preeklampií jsem zařadila všechny ženy s diagnostikovanou PE, bez ohledu na závažnost onemocnění. U některých pacientek byla zároveň přítomna také fetální růstová retardace, proto nese skupina označení PE ± FGR (63 pacientek). Pacientky s diagnózou IUGR nebo SGA jsem spojila do skupiny fetální růstové retardace (FGR, 27 pacientek). Třetí skupinu těhotenských komplikací tvořily pacientky s gestační hypertenzí (GH, 19 pacientek). Všechny skupiny jsem porovnávala vzhledem ke skupině pacientek s fyziologickým průběhem gravidity (FG, 55 pacientek).

a) Absolutní kvantifikace

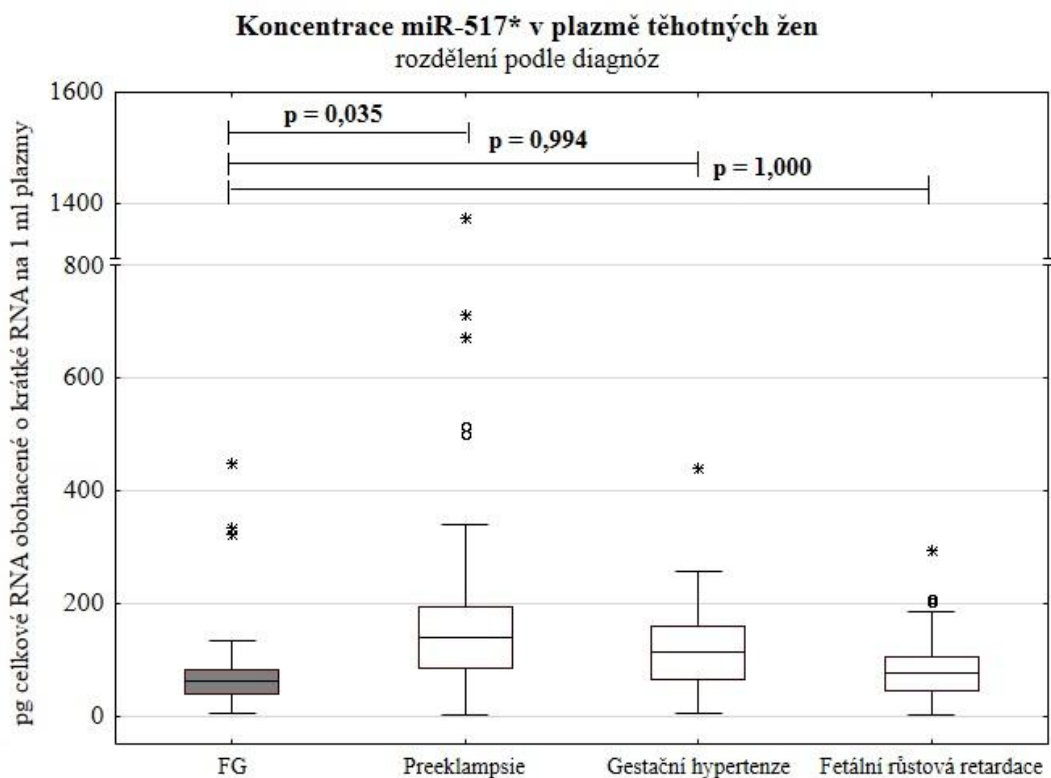
Statisticky významné vyšší koncentrace miRNA u pacientek s těhotenskými komplikacemi byly pozorovány u **miR-517*** ($F = 2,9099$; $df\ 3,160$; $p = 0,036$), **miR-518b** ($F = 3,1975$; $df\ 3,160$; $p = 0,025$), **miR-520a*** ($F = 3,6103$; $df\ 3,160$; $p = 0,015$), **miR-525** ($F = 3,4917$; $df\ 3,160$; $p = 0,017$). U ostatních miRNA nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. Po provedení post-hoc analýzy Bonferroniho testem byly potvrzeny

vyšší hladiny miRNA u pacientek s preeklampií, konkrétně u **miR-517*** ($p = 0,035$), **miR-520a*** ($p = 0,011$), **miR-525** ($p = 0,009$). Všechny výsledky včetně síly testu a 95% intervalu spolehlivosti jsou uvedeny v příloze v tabulce P3. Grafické znázornění výsledků pro miR-517*, miR-520a* a miR-525 je zobrazeno v grafech č. 9, 10 a 11.

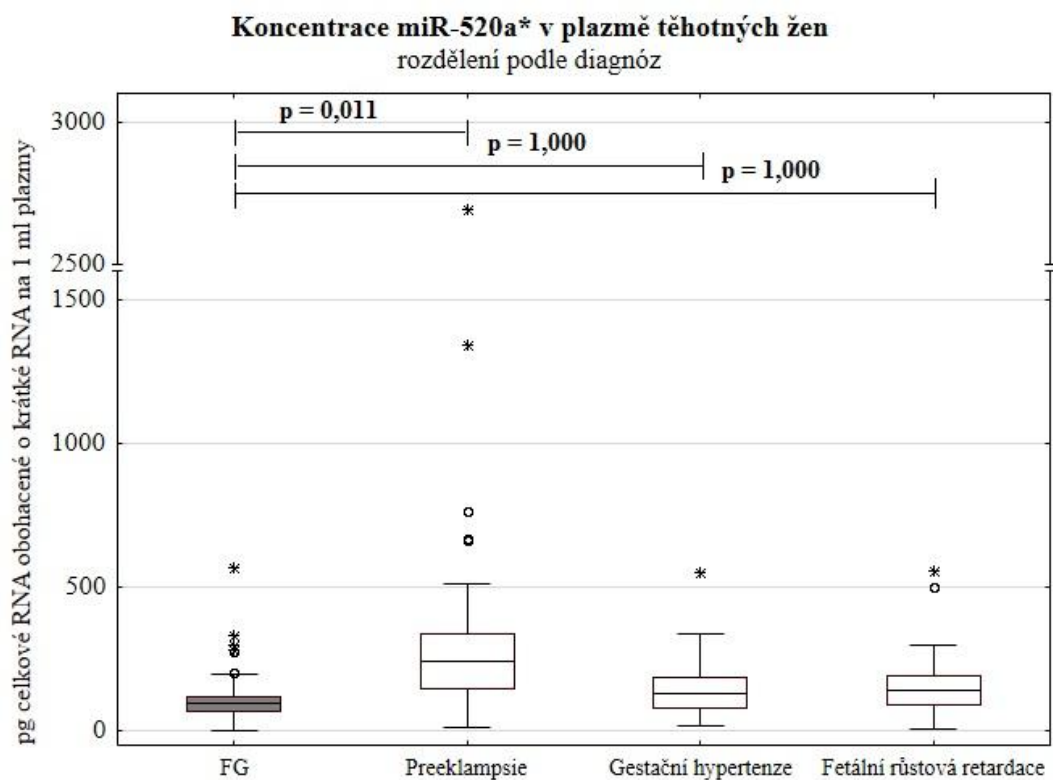
Legenda ke grafům č. 9, 10 a 11



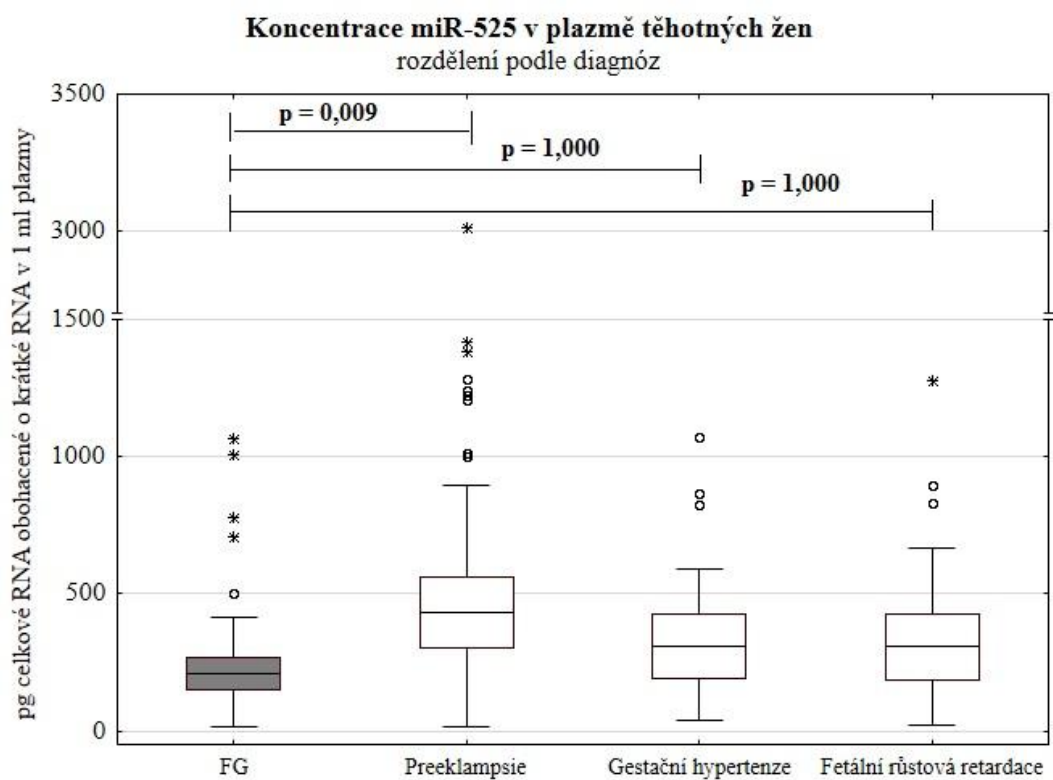
Graf č. 9 Koncentrace miR-517* v plazmě těhotných žen – rozdělení podle diagnóz



Graf č. 10 Koncentrace miR-520a* v plazmě těhotných žen – rozdělení podle diagnóz



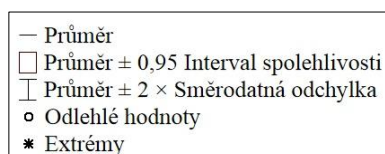
Graf č. 11 Koncentrace miR-525 v plazmě těhotných žen – rozdělení podle diagnóz



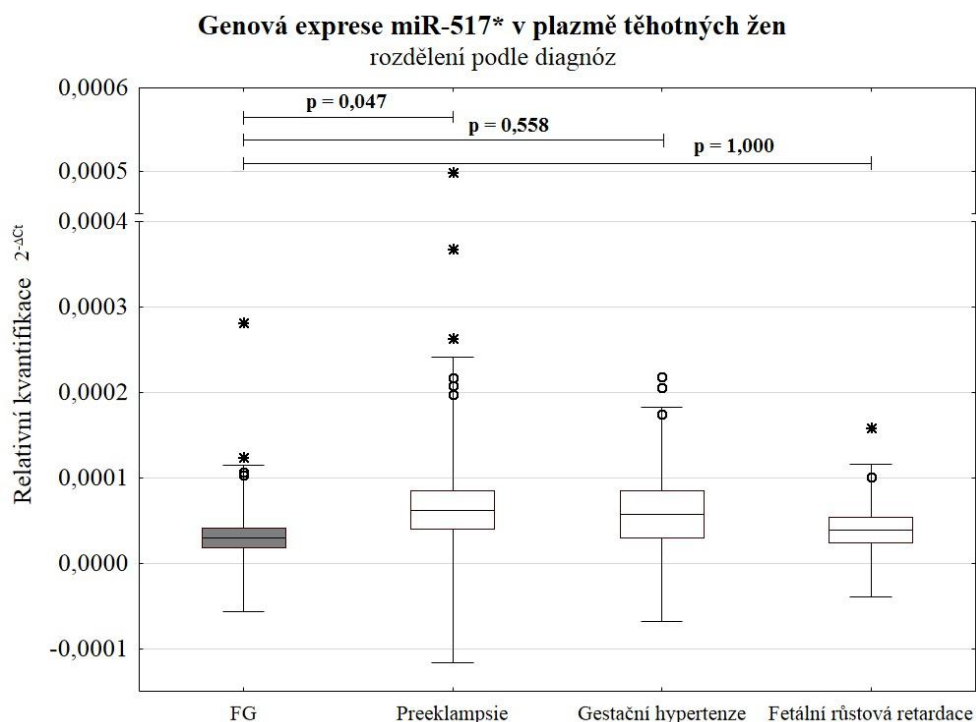
b) Relativní kvantifikace

Následně jsem provedla porovnání genové exprese extracelulárních miRNA u pacientek s těhotenskými komplikacemi (celkový počet 109, rozložení diagnóz: 63 PE ± FGR, 27 FGR, 19 GH) a pacientkami s fyziologickým průběhem gravidity (55 vzorků). Statisticky významná vyšší genová exprese miRNA u pacientek s těhotenskými komplikacemi byla pozorována u **miR-517*** ($F = 2,742$; $df\ 3,160$; $p = 0,045$), **miR-520a*** ($F = 3,3697$; $df\ 3,160$; $p = 0,020$) a **miR-525** ($F = 3,3359$; $df\ 3,160$; $p = 0,021$). U ostatních miRNA nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. Po provedení post-hoc analýzy Bonferroniho testem byla potvrzena vyšší genová exprese u všech výše uvedených miRNA u pacientek s preeklampií, konkrétně u **miR-517*** ($p = 0,047$), **miR-520a*** ($p = 0,013$) a **miR-525** ($p = 0,012$). Kompletní výsledky testu ANOVA jsou uvedeny v příloze v tabulce P4. Graficky jsem zpracovala výsledky všech těhotenských komplikací pro miR-517*, miR-520a* a miR-525 (graf č. 12, 13 a 14).

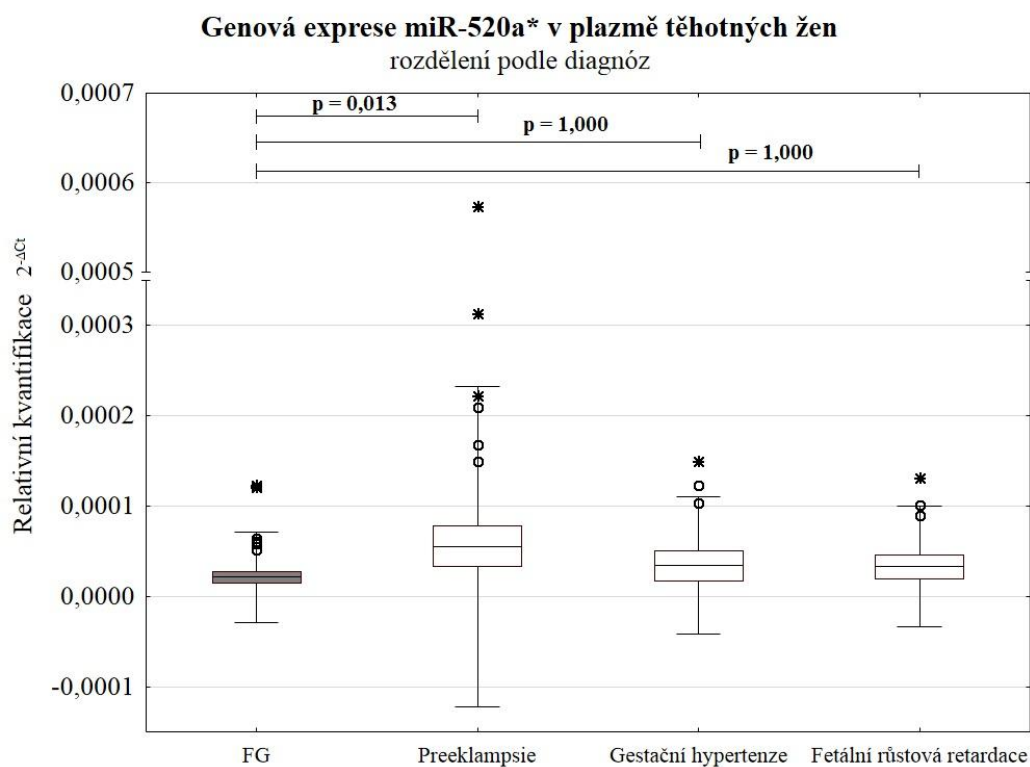
Legenda ke grafům č. 12, 13 a 14



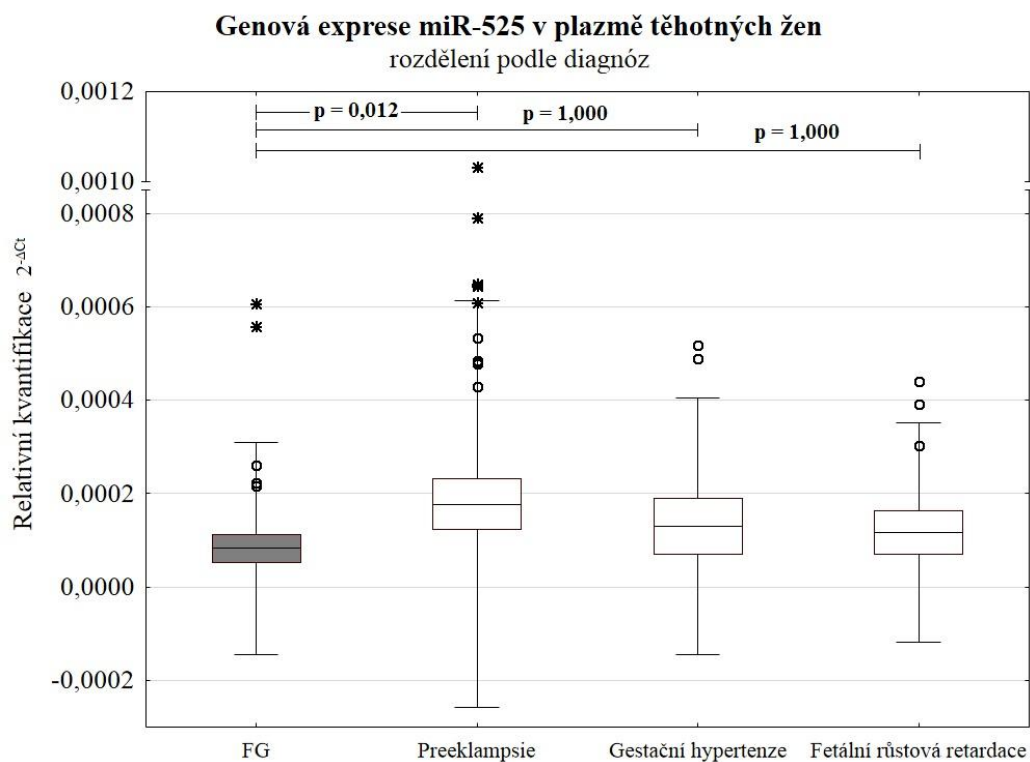
Graf č. 12 Genová exprese miR-517* v plazmě těhotných žen – rozdělení podle diagnóz



Graf č. 13 Genová exprese miR-520a* v plazmě těhotných žen – rozdělení podle diagnóz



Graf č. 14 Genová exprese miR-525 v plazmě těhotných žen – rozdělení podle diagnóz



Protože jediné statisticky signifikantní rozdíly v množství i expresi miRNA byly pozorovány u čisté preeklampsie nebo u preeklampsie v kombinaci s fetální růstovou retardací, zaměřila jsem se v dalších analýzách pouze na ně.

9.3 Koncentrace a genová exprese extracelulárních mikroRNA ve vztahu k závažnosti preeklampsie

Předpokládala jsem, že závažnější forma onemocnění by mohla být důsledkem zvýšené koncentrace a genové exprese miRNA. Hypotézu jsem otestovala pomocí vícefaktorového testu ANOVA. Závažnost preeklampsie jsem hodnotila podle klinických příznaků (mírná nebo závažná PE, F1) a podle týdne ukončení gravidity (porod před nebo po 34. týdnu těhotenství, F2). Hodnoceno bylo celkem 63 pacientek, z toho 51 mělo čistou preeklampsii a 12 preeklampsii v kombinaci s fetální růstovou retardací. Mírná forma byla přítomna u 24 pacientek, závažná u 39 pacientek. Porod před 34. týdnem proběhl ve 24 případech, zbylých 39 pacientek rodilo po 34. týdnu.

a) Absolutní kvantifikace

Porovnávala jsem koncentrace extracelulárních miRNA s ohledem na klinické symptomy onemocnění (mírná vs závažná PE, F1) a na gestační týden ukončení gravidity (před 34. vs po 34. týdnu, F2). Koncentrace vybraných miRNA nebyly ovlivněny klinickou formou onemocnění (F1), týdnem ukončení gravidity (F2) ani interakcí mezi oběma faktory (F). Hodnoty dvoufaktorového testu ANOVA včetně síly testu jsou uvedeny v příloze v tabulce P5.

b) Relativní kvantifikace

Dvoufaktorový test ANOVA jsem provedla i pro relativní kvantifikaci miRNA, kde jsem sledovala genovou expresi jednotlivých miRNA ve vztahu k závažnosti preeklampsie. Neprokázala jsem vliv jednotlivých faktorů F1 a F2 (klinická forma onemocnění a týden ukončení gravidity) na genovou expresi miRNA, stejně tak nebyla genová exprese ovlivněna interakcí mezi oběma faktory (F) u žádné zkoumané miRNA. Hodnoty provedeného testu včetně síly testu jsou uvedeny v příloze v tabulce P6.

9.4 Koncentrace a genová exprese extracelulárních mikroRNA u pacientek s preeklampií vzhledem k předchozímu výskytu hypertenze

Analýza byla provedena u 63 pacientek s preeklampií s nebo bez FGR. U 18 pacientek se jednalo o preeklampií superponovanou na předchozí hypertenzi. U 45 pacientek se hypertenze objevila až jako jeden z projevů preeklampsie. Obě skupiny pacientek jsem porovnávala pomocí testu ANOVA.

a) Absolutní kvantifikace

Koncentrace miRNA v mateřské cirkulaci se u pacientek s preeklampií nasedající na předchozí hypertenzi nelišila od koncentrace miRNA u pacientek bez předchozího výskytu hypertenze. Pro jednotlivé miRNA byly spočítány následující hodnoty: miR-16 ($F = 0,3518$; $df\ 1,61$; $p = 0,555$), let-7d ($F = 0,4883$; $df\ 1,61$; $p = 0,488$), miR-516-5p ($F = 0,5131$; $df\ 1,61$; $p = 0,477$), miR-517* ($F = 0,1055$; $df\ 1,61$; $p = 0,747$), miR-518b ($F = 1,1963$; $df\ 1,61$; $p = 0,278$), miR-520a* ($F = 0,2762$; $df\ 1,61$; $p = 0,601$), miR-520h ($F = 0,8209$; $df\ 1,61$; $p = 0,369$), miR-525 ($F = 0,0000$; $df\ 1,61$; $p = 1,000$), miR-526a ($F = 0,4603$; $df\ 1,61$; $p = 0,500$). Výsledky testu ANOVA včetně síly testu a 95% intervalu spolehlivosti jsou uvedeny v příloze v tabulce P7.

b) Relativní kvantifikace

Genová exprese miRNA se mezi oběma skupinami pacientek (s předchozím výskytem hypertenze a bez předchozího výskytu hypertenze) nelišila. Pro jednotlivé miRNA byly spočítány následující hodnoty: miR-16 ($F = 0,0583$; $df\ 1,61$; $p = 0,810$), let-7d ($F = 0,1391$; $df\ 1,61$; $p = 0,710$), miR-516-5p ($F = 0,0593$; $df\ 1,61$; $p = 0,808$), miR-517* ($F = 0,2924$; $df\ 1,61$; $p = 0,591$), miR-518b ($F = 0,0286$; $df\ 1,61$; $p = 0,866$), miR-520a* ($F = 0,0770$; $df\ 1,61$; $p = 0,782$), miR-520h ($F = 0,2614$; $df\ 1,61$; $p = 0,611$), miR-525 ($F = 0,2585$; $df\ 1,61$; $p = 0,613$), miR-526a ($F = 0,1653$; $df\ 1,61$; $p = 0,686$). Výsledky testu ANOVA včetně síly testu a 95% intervalu spolehlivosti jsou uvedeny v příloze v tabulce P8.

9.5 Vztah dopplerovských parametrů a koncentrace nebo genové exprese extracelulárních miRNA u pacientek s těhotenskými komplikacemi

Hodnoty průtoků cév jsou jedním z ukazatelů závažnosti onemocnění a umožňují lékařům rozhodnutí o dalším průběhu gravidity. Měla jsem k dispozici hodnoty

pulzatilního indexu v *arteria umbilicalis*, pulzatilního indexu v *arteria cerebri media* a hodnotu cerebroplacentárního indexu. Vztah hodnot z dopplerovského ultrazvukového vyšetření a hladin miRNA jsem zkoumala pouze u pacientek s těhotenskými komplikacemi.

9.5.1. Vztah mezi hladinami extracelulárních miRNA a pulzatilním indexem v *arteria umbilicalis*

Nejdříve jsem porovnávala koncentraci a genovou expresi miRNA mezi pacientkami s normálním a patologickým průtokem v *a. umbilicalis*. Měla jsem k dispozici data od 87 pacientek, rozložení diagnóz bylo následující: 3 EH, 24 FGR, 13 GH, 37 PE, 10 PE + FGR. Patologická hodnota pulzatilního indexu v *a. umbilicalis* byla zaznamenána u 28 pacientek, konkrétně u 14 případů s FGR, 6 případů s PE a 8 případů s PE + FGR. Do statistické analýzy jsem záměrně nezařadila pacientky s gestační nebo esenciální hypertenzí. Použila jsem tedy data od 71 pacientek, z nich 43 mělo fyziologický nález průtoku v *a. umbilicalis* a 28 pacientek mělo hodnotu pulzatilního indexu patologickou (nad 95. percentilem pro dané gestační období).

a) Absolutní kvantifikace

Z výsledků analýzy vyplývá, že koncentrace extracelulárních miRNA se mezi skupinou pacientek s patologickou a fyziologickou hodnotou pulzatilního indexu v *a. umbilicalis* neliší. Hodnoty testu byly následující: miR-16 ($F = 0,7493$; $df\ 1,69$; $p = 0,390$), let-7d ($F = 0,0255$; $df\ 1,69$; $p = 0,509$), miR-516-5p ($F = 0,0000$; $df\ 1,69$; $p = 1,000$), miR-517* ($F = 1,0498$; $df\ 1,69$; $p = 0,311$), miR-518b ($F = 0,7007$; $df\ 1,69$; $p = 0,405$), miR-520a* ($F = 0,0002$; $df\ 1,69$; $p = 0,988$), miR-520h ($F = 0,3708$; $df\ 1,69$; $p = 0,545$), miR-525 ($F = 0,3722$; $df\ 1,69$; $p = 0,544$), miR-526a ($F = 0,4414$; $df\ 1,69$; $p = 0,509$). Kompletní výsledky testu ANOVA včetně síly testu a 95% intervalu spolehlivosti jsou uvedeny v příloze v tabulce P9.

Dále jsem hledala vztah mezi koncentracemi extracelulárních miRNA a pulzatilním indexem v *arteria umbilicalis* pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Hodnoty pulzatilního indexu během těhotenství plynule klesají, proto jsem nejdříve provedla jejich úpravu. U každé naměřené hodnoty PI jsem pro daný gestační týden vypočítala odchylku od 95. percentilu, který je považován za hranici fyziologického a patologického nálezu. Odchylky jsem porovnávala s koncentrací extracelulárních miRNA. Vztah mezi PI v *a.*

umbilicalis a koncentracemi miRNA v mateřské cirkulaci jsem neprokázala. Hodnoty korelačního koeficientu byly následující: miR-16 ($\rho = -0,071$; $p = 0,555$), let-7d ($\rho = -0,046$; $p = 0,700$), miR-516-5p ($\rho = -0,023$; $p = 0,845$), miR-517* ($\rho = 0,032$; $p = 0,791$), miR-518b ($\rho = -0,025$; $p = 0,834$), miR-520a* ($\rho = 0,092$; $p = 0,441$), miR-520h ($\rho = 0,016$; $p = 0,893$), miR-525 ($\rho = 0,009$; $p = 0,941$), miR-526a ($\rho = 0,156$; $p = 0,196$). Výsledky korelační analýzy jsou shrnuty v příloze v tabulce P10.

b) Relativní kvantifikace

Stejný typ analýzy jsem provedla také pro genovou expresi miRNA u pacientek s těhotenskými komplikacemi. Test ANOVA neprokázal rozdíl mezi genovou expresí extracelulárních miRNA u pacientek s fyziologickým a patologickým PI v *a. umbilicalis*. Hodnoty testu byly následující: miR-16 ($F = 0,6587$; $df\ 1,69$; $p = 0,420$), let-7d ($F = 0,0084$; $df\ 1,69$; $p = 0,927$), miR-516-5p ($F = 0,5074$; $df\ 1,69$; $p = 0,479$), miR-517* ($F = 0,0015$; $df\ 1,69$; $p = 0,970$), miR-518b ($F = 1,5794$; $df\ 1,69$; $p = 0,213$), miR-520a* ($F = 0,1721$; $df\ 1,69$; $p = 0,680$), miR-520h ($F = 1,5436$; $df\ 1,69$; $p = 0,218$), miR-525 ($F = 0,0082$; $df\ 1,69$; $p = 0,928$), miR-526a ($F = 0,1348$; $df\ 1,69$; $p = 0,715$). Kompletní výsledky testu ANOVA včetně síly testu a 95% intervalu spolehlivosti jsou uvedeny v příloze v tabulce P11.

Vztah mezi genovou expresí miRNA a hodnotami PI v *a. umbilicalis* jsem hodnotila pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Hodnoty pulzatilního indexu jsem nejdříve u každé pacientky upravila tak, aby vyjadřoval odchylku od 95. percentilu pro daný gestační týden. Výsledky korelačního testu byly následující: miR-16 ($\rho = -0,093$; $p = 0,435$), let-7d ($\rho = -0,041$; $p = 0,731$), miR-516-5p ($\rho = -0,040$; $p = 0,736$), miR-517* ($\rho = 0,073$; $p = 0,542$), miR-518b ($\rho = -0,019$; $p = 0,872$), miR-520a* ($\rho = 0,085$; $p = 0,477$), miR-520h ($\rho = 0,038$; $p = 0,748$), miR-525 ($\rho = -0,028$; $p = 0,812$), miR-526a ($\rho = 0,131$; $p = 0,277$). Mezi hodnotami pulzatilního indexu v *a. umbilicalis* a genovou expresí vybraných extracelulárních miRNA jsem neodhalila žádnou závislost. Výsledky korelační analýzy jsou shrnuty v příloze v tabulce P12.

9.5.2 Vztah mezi hladinami extracelulárních miRNA a pulzatilním indexem v *arteria cerebri media*

Dalším měřeným ukazatelem v rámci dopplerovské flowmetrie je pulzatilní index v *arteria cerebri media*. Opět jsem nejdříve hodnotila pouze množství nebo expresi

miRNA vzhledem k normální nebo patologické hodnotě PI v *a. cerebri media* (bez ohledu na jeho číselnou hodnotu). Získala jsem data od 51 pacientek, rozložení diagnóz bylo následující: 22 FGR, 18 PE, 11 PE + FGR. Patologický průtok v *a. cerebri media* se objevil u 21 z nich, konkrétně u 11 případů FGR, 5 případů PE a 5 případů PE + FGR. Pro odhalení vztahu mezi oběma hodnotami (hladinou miRNA a pulzatilním indexem) jsem provedla výpočet Spearmanova korelačního koeficientu. Před výpočtem korelačního koeficientu jsem provedla úpravu hodnot pulzatilního indexu. Za patologický nález v *a. cerebri media* je považována hodnota indexu pod 5. percentilem pro daný týden gravidity. Během těhotenství nejdříve jeho hodnota stoupá (až do 32. týdne) a poté klesá. Proto jsem pro každou pacientku provedla výpočet odchylky od 5. percentilu pro daný gestační týden a tuto hodnotu jsem porovnávala s koncentrací nebo genovou expresí miRNA.

a) Absolutní kvantifikace

Koncentrace extracelulárních miRNA byla porovnávána u skupiny pacientek s fyziologickou a patologickou hodnotou PI v *a. cerebri media*. Podle výsledků se množství vybraných miRNA v cirkulaci matky mezi dvěma definovanými skupinami neliší. Výsledky ANOVA testu byly následující: miR-16 ($F = 1,0315$; $df\ 1,49$; $p = 0,315$), let-7d ($F = 0,0003$; $df\ 1,49$; $p = 0,986$), miR-516-5p ($F = 0,5479$; $df\ 1,49$; $p = 0,463$), miR-517* ($F = 0,1688$; $df\ 1,49$; $p = 0,683$), miR-518b ($F = 0,0056$; $df\ 1,49$; $p = 0,941$), miR-520a* ($F = 0,0417$; $df\ 1,49$; $p = 0,839$), miR-520h ($F = 0,0015$; $df\ 1,49$; $p = 0,970$), miR-525 ($F = 0,4311$; $df\ 1,49$; $p = 0,515$), miR-526a ($F = 0,6362$; $df\ 1,49$; $p = 0,429$). Kompletní výsledky testu ANOVA včetně síly testu a 95% intervalu spolehlivosti jsou uvedeny v příloze v tabulce P13.

Korelační analýza odhalila závislost množství miRNA a hodnoty PI v *a. cerebri media* u šesti zkoumaných miRNA. Slabá negativní korelace byla nalezena u těchto miRNA: **let-7d** ($\rho = -0,318$; $p = 0,032$), **miR-516-5p** ($\rho = -0,393$; $p = 0,005$), **miR-517*** ($\rho = -0,328$; $p = 0,020$), **miR-520a*** ($\rho = -0,314$; $p = 0,027$), **miR-525** ($\rho = -0,358$; $p = 0,011$), **miR-526a** ($\rho = -0,304$; $p = 0,032$). Slabá negativní korelace v tomto případě znamená, že zvýšenou koncentrací miRNA v mateřské cirkulaci doprovázely nižší hodnoty pulzatilního indexu v *arteria cerebri media*. Kompletní výsledky korelační analýzy pro všechny miRNA jsou uvedeny v příloze v tabulce P14.

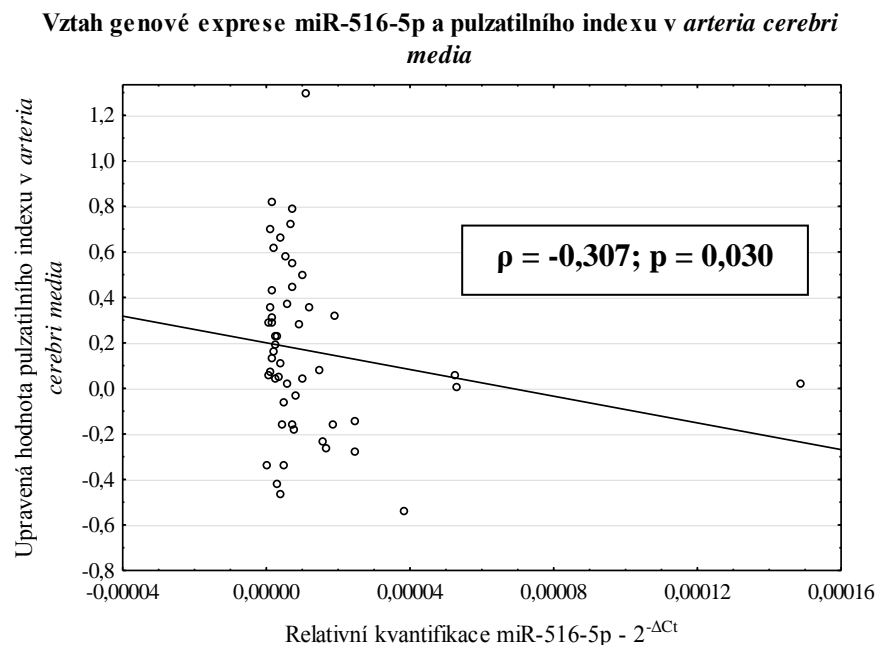
b) Relativní kvantifikace

Genovou expresi jsem porovnávala mezi skupinou 30 pacientek s fyziologickou hodnotou PI v *arteria cerebri media* a skupinou 21 pacientek s patologickou hodnotou PI v *a. cerebri media*. Podle výsledků nebyl mezi oběma skupinami statisticky signifikantní rozdíl v genové expresi vybraných extracelulárních miRNA. Hodnoty testu ANOVA byly následující: miR-16 ($F = 1,4327$; $df\ 1,49$; $p = 0,237$), let-7d ($F = 1,4171$; $df\ 1,49$; $p = 0,240$), miR-516-5p ($F = 0,3150$; $df\ 1,49$; $p = 0,577$), miR-517* ($F = 0,0059$; $df\ 1,49$; $p = 0,939$), miR-518b ($F = 0,4716$; $df\ 1,49$; $p = 0,496$), miR-520a* ($F = 0,0119$; $df\ 1,49$; $p = 0,914$), miR-520h ($F = 0,3448$; $df\ 1,49$; $p = 0,560$), miR-525 ($F = 0,0004$; $df\ 1,49$; $p = 0,985$), miR-526a ($F = 0,0022$; $df\ 1,49$; $p = 0,963$). Výsledky testu ANOVA včetně síly testu a 95% intervalu spolehlivosti jsou uvedeny v příloze v tabulce P15.

Korelační analýza potvrdila výsledky absolutní kvantifikace u pěti miRNA. Slabá negativní korelace byla nalezena u: **miR-516-5p** ($\rho = -0,307$; $p = 0,030$), **miR-517*** ($\rho = -0,288$; $p = 0,041$), **miR-520a*** ($\rho = -0,339$; $p = 0,017$), **miR-525** ($\rho = -0,357$; $p = 0,012$), **miR-526a** ($\rho = -0,286$; $p = 0,043$). Vyšší genovou expresi uvedených miRNA doprovázela nižší hodnota pulzatilního indexu v *a. cerebri media*. Kompletní výsledky korelační analýzy jsou uvedeny v příloze v tabulce P16. Vztah slabé negativní korelace jsem znázornila v grafech 15 až 19.

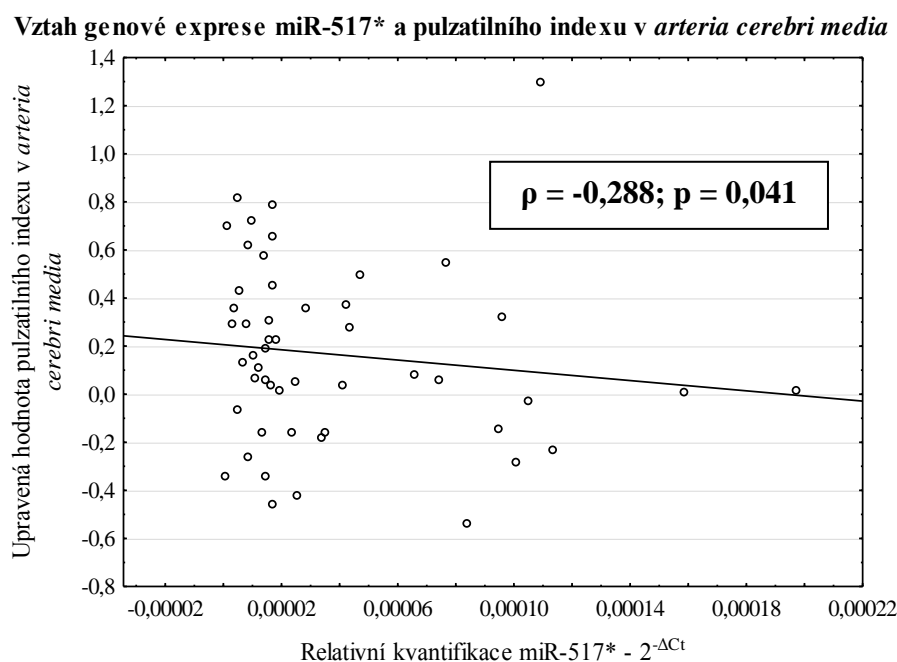
Graf č. 15 Vztah genové exprese miR-516-5p a pulzatilního indexu v *arteria cerebri media*

Upravenou hodnotu PI v *a. cerebri media* jsem získala odečtením hodnoty PI pro 5. percentil v daném gestačním týdnu od hodnoty naměřené při ultrazvukovém vyšetření. Záporné hodnoty na ose y proto reprezentují pacientky s patologickou hodnotou PI v *a. cerebri media*.



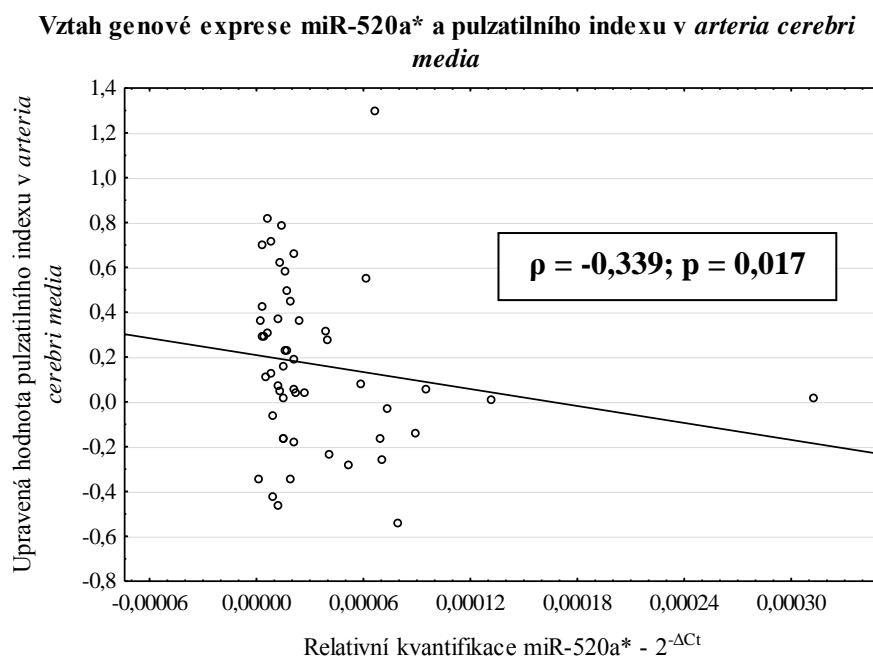
Graf č. 16 Vztah genové exprese miR-517* a pulzatilního indexu v *arteria cerebri media*

Upravenou hodnotu PI v *a. cerebri media* jsem získala odečtením hodnoty PI pro 5. percentil v daném gestačním týdnu od hodnoty naměřené při ultrazvukovém vyšetření. Záporné hodnoty na ose y proto reprezentují pacientky s patologickou hodnotou PI v *a. cerebri media*.



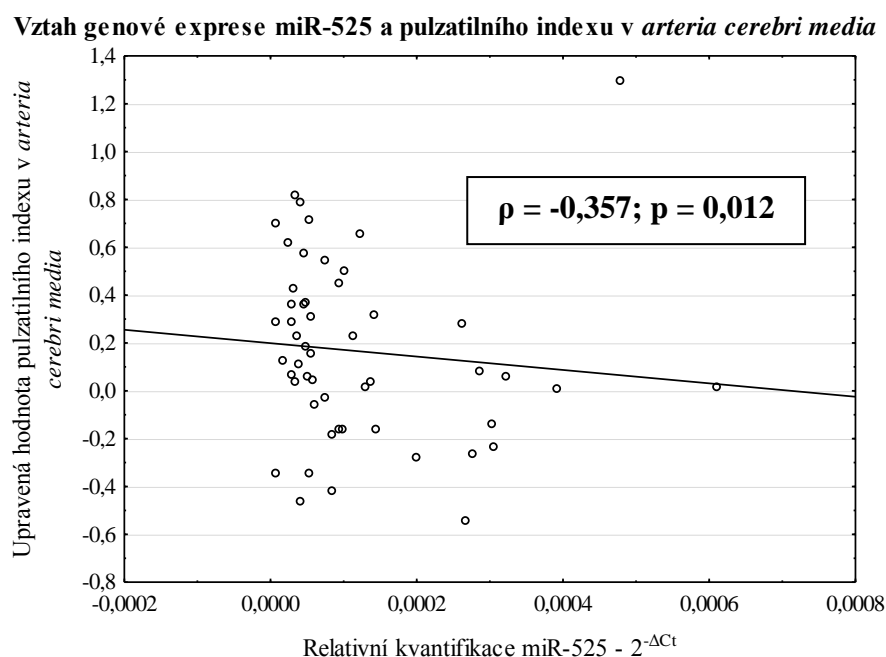
Graf č. 17 Vztah genové exprese miR-520a* a pulzatilního indexu v *arteria cerebri media*

Upravenou hodnotu PI v *a. cerebri media* jsem získala odečtením hodnoty PI pro 5. percentil v daném gestačním týdnu od hodnoty naměřené při ultrazvukovém vyšetření. Záporné hodnoty na ose y proto reprezentují pacientky s patologickou hodnotou PI v *a. cerebri media*.



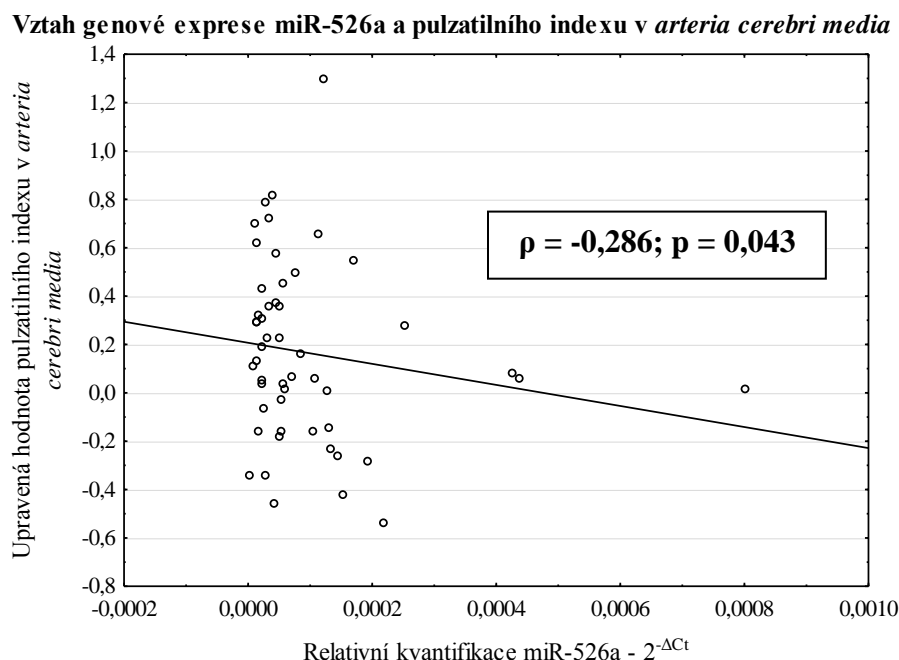
Graf č. 18 Vztah genové exprese miR-525 a pulzatilního indexu v *arteria cerebri media*

Upravenou hodnotu PI v *a. cerebri media* jsem získala odečtením hodnoty PI pro 5. percentil v daném gestačním týdnu od hodnoty naměřené při ultrazvukovém vyšetření. Záporné hodnoty na ose y proto reprezentují pacientky s patologickou hodnotou PI v *a. cerebri media*.



Graf č. 19 Vztah genové exprese miR-526a a pulzatilního indexu v *arteria cerebri media*

Upravenou hodnotu PI v *a. cerebri media* jsem získala odečtením hodnoty PI pro 5. percentil v daném gestačním týdnu od hodnoty naměřené při ultrazvukovém vyšetření. Záporné hodnoty na ose y proto reprezentují pacientky s patologickou hodnotou PI v *a. cerebri media*.



9.5.3 Vztah mezi hladinami extracelulárních miRNA a cerebroplacentárním indexem

Cerebroplacentární index vyjadřuje poměr mezi PI v *a. cerebri media* a PI v *a. umbilicalis*. Stejně jako v předchozích dvou případech jsem nejdříve hodnotila pouze množství nebo expresi miRNA vzhledem k normální nebo patologické hodnotě indexu. Získala jsem data od 50 pacientek, rozložení diagnóz bylo následující: 22 FGR, 17 PE, 11 PE + FGR. Patologická hodnota CPI se objevila u 21 z nich, konkrétně u 12 případů FGR, 3 případů PE a 6 případů PE + FGR. Následně jsem provedla výpočet Spearmanova korelačního koeficientu. Hodnoty cerebroplacentárního indexu se během těhotenství mění podobně jako hodnoty pulzatilního indexu v *arteria cerebri media*, za patologickou hodnotu je považován nález pod 5. percentilem pro daný gestační týden. Pro každou pacientku jsem spočítala odchylku od 5. percentilu a tu jsem porovnávala s množstvím (příp. genovou expresí) miRNA.

a) Absolutní kvantifikace

Pacientky s fyziologickou hodnotou cerebroplacentárního indexu se v množství miRNA nelišily od pacientek s patologickou hodnotou CPI. Výsledky testu ANOVA byly následující: miR-16 ($F = 0,6824$; $df = 1,48$; $p = 0,413$), let-7d ($F = 0,0871$; $df = 1,48$; $p = 0,769$), miR-516-5p ($F = 0,1983$; $df = 1,48$; $p = 0,658$), miR-517* ($F = 0,0862$; $df = 1,48$; $p = 0,770$), miR-518b ($F = 0,0403$; $df = 1,48$; $p = 0,842$), miR-520a* ($F = 0,0201$; $df = 1,48$; $p = 0,888$), miR-520h ($F = 0,0535$; $df = 1,48$; $p = 0,818$), miR-525 ($F = 1,1399$; $df = 1,48$; $p = 0,272$), miR-526a ($F = 0,0873$; $df = 1,48$; $p = 0,769$). Výsledky testu ANOVA včetně analýzy síly testu a 95% intervalu spolehlivosti jsou uvedeny v příloze v tabulce P17.

Pro stejný soubor 50 pacientek jsem provedla korelační analýzu. Porovnávala jsem odchylky CPI od 5. percentilu pro daný týden gravidity s množstvím miRNA v mateřské cirkulaci. Vzájemnou závislost obou hodnot jsem nenalezla u osmi miRNA, konkrétně u: miR-16 ($\rho = -0,240$; $p = 0,092$), let-7d ($\rho = -0,226$; $p = 0,114$), miR-516-5p ($\rho = -0,219$; $p = 0,125$), miR-517* ($\rho = -0,215$; $p = 0,131$), miR-518b ($\rho = -0,074$; $p = 0,606$), miR-520a* ($\rho = -0,261$; $p = 0,067$), miR-520h ($\rho = -0,177$; $p = 0,214$), miR-525 ($\rho = -0,190$; $p = 0,183$). Slabá negativní korelace se projevila u **miR-526a** ($\rho = -0,340$; $p = 0,017$). Nižší hodnotu CPI doprovázela vyšší koncentrace extracelulární miR-526a. Výsledky korelační analýzy jsou uvedeny v příloze v tabulce P18.

b) Relativní kvantifikace

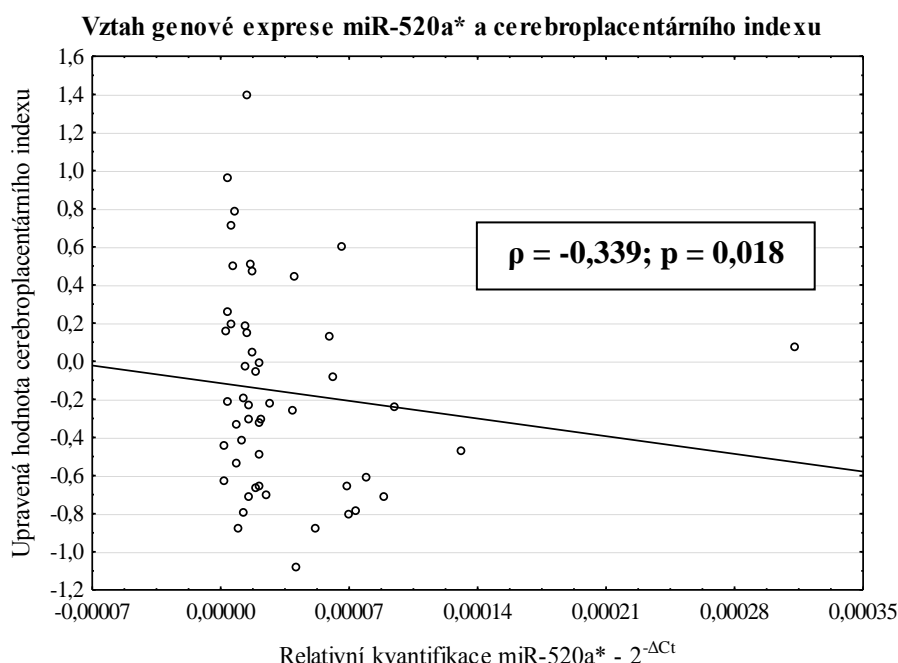
Porovnávala jsem genovou expresi u 29 pacientek s fyziologickou hodnotou cerebroplacentárního indexu a 21 pacientek s patologickou hodnotou CPI. Z výsledků testu ANOVA vyplývá, že exprese vybraných extracelulárních miRNA se neliší u pacientek s fyziologickou a patologickou hodnotou CPI. Výsledky testu byly následující: miR-16 ($F = 1,2748$; $df = 1,48$; $p = 0,264$), let-7d ($F = 0,7200$; $df = 1,48$; $p = 0,400$), miR-516-5p ($F = 0,0011$; $df = 1,48$; $p = 0,974$), miR-517* ($F = 0,7023$; $df = 1,48$; $p = 0,406$), miR-518b ($F = 0,2315$; $df = 1,48$; $p = 0,633$), miR-520a* ($F = 0,1163$; $df = 1,48$; $p = 0,735$), miR-520h ($F = 0,3159$; $df = 1,48$; $p = 0,577$), miR-525 ($F = 0,0000$; $df = 1,48$; $p = 0,998$), miR-526a ($F = 0,2603$; $df = 1,48$; $p = 0,612$). Kompletní výsledky včetně síly testu a 95% intervalu spolehlivosti jsou uvedeny v příloze v tabulce P19.

Pro soubor 50 pacientek s těhotenskými komplikacemi jsem provedla výpočet korelačního koeficientu. Porovnávala jsem odchylky CPI od 5. percentilu pro daný gestační týden s genovou expresí extracelulárních miRNA. U sedmi miRNA jsem

nenalezla mezi hodnotou CPI a genovou expresí žádný vztah, výsledky korelační analýzy byly následující: miR-16 ($\rho = -0,186$; $p = 0,191$), let-7d ($\rho = -0,212$; $p = 0,138$), miR-516-5p ($\rho = -0,190$; $p = 0,182$), miR-517* ($\rho = -0,269$; $p = 0,060$), miR-518b ($\rho = -0,167$; $p = 0,242$), miR-520h ($\rho = -0,219$; $p = 0,126$), miR-525 ($\rho = -0,185$; $p = 0,194$). Slabou negativní korelaci jsem odhalila u **miR-520a*** ($\rho = -0,339$; $p = 0,018$), **miR-526a** ($\rho = -0,329$; $p = 0,021$). Výsledky korelační analýzy jsou uvedeny v příloze v tabulce P20. Vztah slabé negativní korelace jsem znázornila v grafech 20 a 21.

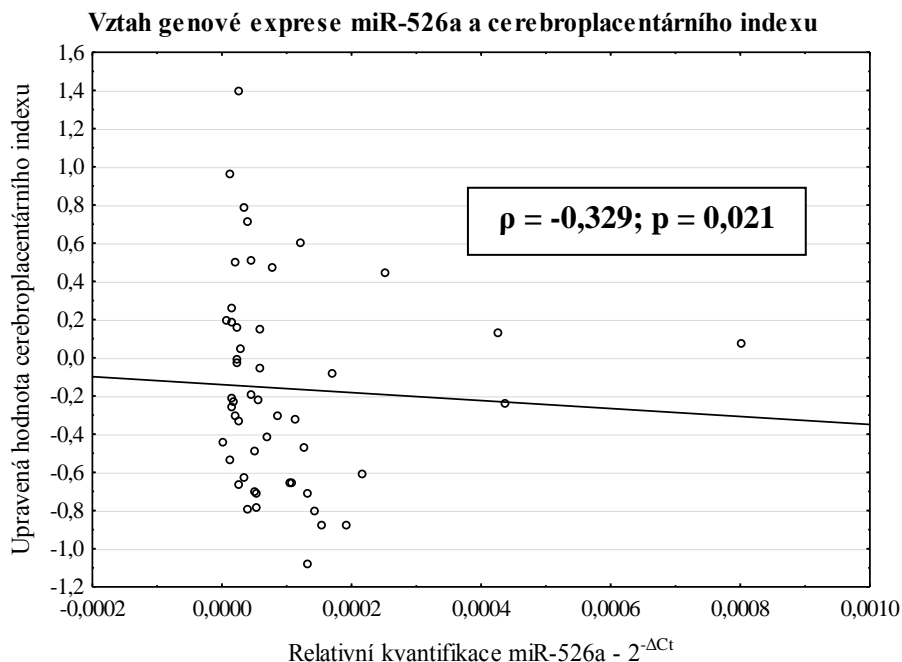
Graf č. 20 Vztah genové exprese miR-520a* a cerebroplacentárního indexu

Upravenou hodnotu cerebroplacentárního indexu jsem získala odečtením hodnoty CPI pro 5. percentil v daném gestačním týdnu od hodnoty naměřené při ultrazvukovém vyšetření. Záporné hodnoty na ose y proto reprezentují pacientky s patologickou hodnotou CPI.



Graf č. 21 Vztah genové exprese miR-526a a cerebroplacentárního indexu

Upravenou hodnotu cerebroplacentárního indexu jsem získala odečtením hodnoty CPI pro 5. percentil v daném gestačním týdnu od hodnoty naměřené při ultrazvukovém vyšetření. Záporné hodnoty na ose y proto reprezentují pacientky s patologickou hodnotou CPI.



V další části práce jsem se podílela na zpracování vzorků plazmy, které byly zařazeny do prospektivní studie. Pro její účely jsem prozatím zpracovala 78 vzorků, z nich pouze 20 vzorků pochází od pacientek, kterým byla později diagnostikována některá ze studovaných komplikací (PE, FGR, GH). Vzhledem k nízkému počtu vzorků od pacientek s těhotenskými komplikacemi nebylo dosud provedeno statistické zhodnocení získaných experimentálních dat a bude vypracováno až po získání dostatečného počtu vzorků.

10. Diskuze

Výsledky diplomové práce potvrzují, že v mateřské cirkulaci lze úspěšně detekovat placentárně specifické miRNA u pacientek s fyziologickým průběhem gravidity i u pacientek s těhotenskými komplikacemi. Statisticky významná zvýšená koncentrace a genová exprese extracelulárních miRNA byla pozorována u pacientek s preeklampií v případě miR-517*, miR-520a* a miR-525. Síla testu se pro všechny tři miRNA pohybovala nad hodnotou 65 %. Rozdíl v hladinách extracelulárních miRNA nebyl pozorován u miR-516-5p, miR-518b, miR-520h a miR-526a. Kontrolní skupinu tvořily pacientky s fyziologickým průběhem gravidity. U pacientek s fetální růstovou retardací a gestační hypertenzí nebyl prokázán rozdíl v hladinách sedmi vybraných extracelulárních placentárně specifických miRNA oproti kontrolní skupině.

Předpokládala jsem, že závažnost preeklampsie by mohla odrážet hladiny miRNA v krevním řečišti. Závažnost onemocnění byla charakterizována formou onemocnění (mírná a závažná PE) a termínem porodu (před nebo po 34. týdnu gravidity). Tento předpoklad se nepotvrdil. Vliv na hladiny miRNA v krevním řečišti u pacientek s diagnostikovanou PE nemá ani preexistující hypertenze.

Hodnoty z dopplerovské flowmetrie jsem získala pouze od některých pacientek. V případě PI v *arteria cerebri media* a CPI jsme pozorovali slabou negativní korelaci mezi koncentrací (příp. genovou expresí) a naměřeným indexem. Čím nižší hodnota indexu, tím je nález závažnější a riziko poškození plodu vyšší. Slabá negativní korelace naznačila, že vážnější nález z ultrazvuku doprovázejí vyšší hladiny miRNA v krvi matky.

Identifikací extracelulárních miRNA u pacientek s PE se zabývá řada dalších autorů (Yang *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012; Gunel *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012). Yang *et al.* zkoumali expresní profil extracelulárních miRNA v krevním séru pomocí metody sekvenování nové generace. Identifikovali 15 miRNA, které vykazovaly u pacientek s PE vyšší genovou expresi. Je mezi nimi také miR-520h, která v mé studii nevykazovala žádné rozdíly v koncentraci nebo genové expresi mezi skupinou pacientek s fyziologickým průběhem gravidity a skupinou pacientek s preeklampií. Dále identifikovali sedm miRNA, které vykazovaly u pacientek s preeklampií nižší genovou expresi. Byla mezi nimi také let-7d, kterou jsme v této studii chtěli použít jako endogenní kontrolu. Výsledky Yang *et al.* se s mými výsledky ani v tomto případě neshodují. Kompletní výsledky této studie jsou uvedeny v tabulce č. 2. Sekvenování bylo provedeno na malém počtu

pacientek, analyzovány byly čtyři vzorky od pacientek s preeklampií a pouze jeden vzorek od pacientky s fyziologickým průběhem gravidity (Yang *et al.*, 2011).

Další studie byla provedena na skupině 19 pacientek, kde 10 pacientek mělo diagnostikovanou závažnou formu PE a 9 pacientek tvořilo kontrolní skupinu. Analyzovány byly stejně jako v našem případě vzorky plazmy. Použity byly dvě metody, mikročipy a PCR v reálném čase. Na základě metody mikročipů bylo nalezeno 13 miRNA se zvýšenou genovou expresí u pacientek se závažnou PE a dvě miRNA se sníženou genovou expresí u pacientek se závažnou PE. Po provedení PCR v reálném čase byla potvrzena vyšší genová exprese u sedmi miRNA: MiR-24, miR-26a, miR-103, miR-130b, miR-181a, miR-342-3p, miR-574-5p (Wu *et al.*, 2012). Dosud nejlépe prostudovanou je miR-181a, která je upregulovaná také v placentách pacientek s PE (Hu *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2009). MiR-181a reguluje činnost T-lymfocytů; inhibice exprese miR-181a vede ke snížení citlivosti T-buněk k antigenům a k nedostatečné pozitivní i negativní selekci T-buněk (Li *et al.*, 2007).

V roce 2012 byly publikovány dvě práce, které se zabývaly extracelulárními miRNA u pacientek s preeklampií (Gunel *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012). V obou studiích bylo vyšetřeno 40, respektive 45 pacientek a byla použita metoda PCR v reálném čase. Studie prokázaly vyšší genovou expresi miR-210 u pacientek s PE (Gunel *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012) a nižší genovou expresi miR-152 (Gunel *et al.*, 2012). Ani jedna z uvedených miRNA není placentárně specifická. Exprese miR-210 je podpořena tkáňovou hypoxií (Camps *et al.*, 2008), gen je lokalizován na chromosomu č. 11 a k expresi dochází v mnoha lidských buňkách a tkáních.

Podstatně menší počet studií se zabývá extracelulárními miRNA v mateřské cirkulaci u pacientek s fetální růstovou retardací. Prozatím byly prezentovány pouze rozdíly v genové expresi na vzorcích placentární tkáně, kde byla objevena nižší genová exprese miR-16 a miR-21 (Maccani *et al.*, 2011). Higashijima *et al.* objevili čtyři downregulované miRNA v placentě pacientek s FGR (miR-518b, miR-1323, miR-520h a miR-519d), následně provedli jejich kvantifikaci v mateřské cirkulaci. Rozdíl v genové expresi v plazmě pacientek s FGR a pacientek s graviditou bez komplikací nebyl statisticky významný (Higashijima *et al.*, 2013). Naše výsledky se v tomto případě se studií shodují, ani v naší analýze se koncentrace a genová exprese miR-518b a miR-520h nelišila mezi skupinou pacientek s FGR a skupinou pacientek s fyziologickým průběhem gravidity.

Z hlediska velikosti zkoumaného souboru je studie z naší laboratoře unikátní. Provedli jsme analýzu 168 vzorků krevní plazmy, z nichž 63 vzorků pocházelo od pacientek s diagnostikovanou PE, 23 vzorků pocházelo od pacientek s hypertenzí a 27 vzorků jsme získali od pacientek s fetální růstovou retardací. Kontrolní skupina pacientek s fyziologickým průběhem těhotenství zahrnovala 55 těhotných žen. Koncentrace a genová exprese sedmi zkoumaných extracelulárních placentárně specifických miRNA (miR-516-5p, miR-517*, miR-518b, miR-520a*, miR-520h, miR-525 a miR-526a) prozatím nebyla v žádné studii publikována se statisticky významnými rozdíly mezi skupinou pacientek s těhotenskými komplikacemi a pacientkami s fyziologickým průběhem gravidity. Výjimkou je miR-520h v práci Yang *et al.*, která se však s našimi výsledky neshoduje (Yang *et al.*, 2011).

Kromě sedmi placentárně specifických miRNA jsme do studie zařadili další dvě všudypřítomné miRNA, které měly být použity jako endogenní kontrola (miR-16 a let-7d). Byly vybrány na základě předchozích referencí v literatuře (citace) i na základě předešlé studie v naší laboratoři. Během poslední studie, kterou jsme prováděli na placentách a která není předmětem diplomové práce, jsme identifikovali statisticky signifikantní sníženou genovou expresi miR-16 na placentách pacientek s PE (manuskript je v recenzním řízení). Podobné výsledky prezentovali také Maccani *et al.*, kteří pozorovali sníženou genovou expresi miR-16 v placentární tkáni pacientek s diagnózou SGA (Maccani *et al.*, 2011). Následně byla potvrzena downregulace extracelulární miR-16 v plazmě pacientek se závažnou PE (Wu *et al.*, 2012). Genová exprese extracelulární let-7d je také snížena u pacientek s PE (Yang *et al.*, 2011). Pro příští analýzy bude nutné nalézt jinou vhodnou endogenní kontrolu.

Všechny zkoumané placentárně specifické miRNA jsou kódované na chromosomu 19 v klastru C19MC. Biologická funkce placentárně specifických miRNA v placentě a v mateřské cirkulaci není prozatím dostatečně prozkoumaná. Na základě sekvence miRNA lze vyhledat mRNA, které jsou s danou miRNA komplementární (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>). Nelze však říci, zda a s jakou pravděpodobností k regulaci skutečně dochází. Komplementární sekvence k miR-517* je dokumentována na 5742 místech různých mRNA, u miR-520a* je tento počet 8575 a miR-525 je komplementární k 8543 mRNA. Sekvence v oblasti druhého až osmého nukleotidu miR-520a* a miR-525 jsou si velice podobné, proto se jejich cílová místa na mRNA často

shodují. Komplementární sekvence ke všem třem miRNA na jediné molekule mRNA lze nalézt u 3204 mRNA. Z důvodu vysokého počtu potenciálních cílových mRNA není reálné odhalit na základě této analýzy roli miR-517*, miR-520a* a miR-525 v patogenezi preeklampsie.

Zaměřila na proteiny a dráhy, jejichž funkce je u pacientek s preeklampií abnormální a hledala jsem v sekvenci jejich mRNA vazebná místa pro upregulované miR-517*, miR-520a* a miR-525. Všechny tři upregulované miRNA jsou schopny vázat se a regulovat expresi receptoru pro angiogenní faktor VEGF (VEGFR = FLT1). MiR-520a* a miR-525 se mohou účastnit také regulace samotného VEGF, který se u pacientek s PE nachází ve sníženém množství (Maynard *et al.*, 2003). Komplementární sekvence pro všechny tři miRNA se nachází také v molekule receptoru pro Aktivin (AKVRL1). Aktivin A se uplatňuje v procesu diferenciaci a invaze trofoblastu (Giguère *et al.*, 2009). MiR-520a* a miR-525 mohou ovlivňovat expresi placentárního růstového faktoru (PGF), společně s miR-517* mohou regulovat expresi transformujícího růstového faktoru $\beta 3$ (TGF $\beta 3$). Všechny výše uvedené proteiny jsou součástí signalizačních drah v procesu angiogeneze, regulace prostřednictvím miRNA by mohla vést k jejich abnormálnímu množství v těle matky a přispět k rozvoji preeklampsie.

11. Závěr

Ve své práci jsem potvrdila přítomnost sedmi vybraných placentárně specifických miRNA v cirkulaci matky. Identifikovala jsem tři placentárně specifické miRNA, které se v krevní plazmě pacientek s preeklampií nachází ve vyšším množství (miR-517*, miR-520a*, miR-525). Vyšší množství bylo potvrzeno metodou absolutní i relativní kvantifikace. Rozdíly v koncentraci a genové expresi třech uvedených extracelulárních miRNA mezi skupinou pacientek s fyziologickým průběhem gravidity a skupinou pacientek s preeklampií byly statisticky signifikantní ($p < 0,05$). U dvou miRNA (miR-516-5p a miR-520h) jsem neprokázala rozdíl v koncentraci ani genové expresi mezi pacientkami s fyziologickým průběhem těhotenství a pacientkami s preeklampií. Dvě miRNA vykazovaly na základě absolutní kvantifikace vyšší koncentraci v plazmě pacientek s preeklampií, ale relativní kvantifikace výsledky nepotvrdila (miR-518b a miR-526a). Hladina všech sedmi vybraných extracelulárních miRNA se nelišila u pacientek s fetální růstovou retardací nebo hypertenzí oproti pacientkám bez komplikací.

Pacientkám s preeklampií byla diagnostikována mírná nebo závažná forma onemocnění. Charakter preeklampsie neměl vliv na koncentraci ani genovou expresi všech vybraných placentárně specifických miRNA v mateřské cirkulaci. Stejně tak nebyl nalezen vztah mezi hladinou miRNA a termínem ukončení gravidity (před nebo po 34. týdnu těhotenství). U více než čtvrtiny pacientek s diagnostikovanou preeklampií se jednalo o preeklampií superponovanou na předchozí hypertenzi. Předchozí výskyt hypertenze také neměl vliv na hladiny vybraných extracelulárních miRNA.

Ultrazvukové vyšetření krevního toku v cévách placenty i plodu je důležitým ukazatelem správného vývoje placenty a plodu. Zabývala jsem se třemi parametry: pulzatilním indexem v *arteria umbilicalis*, pulzatilním indexem v *arteria cerebri media* a cerebroplacentárním indexem. Porovnávala jsem koncentraci a genovou expresi placentárně specifických miRNA mezi skupinou pacientek s fyziologickou hodnotou pulzatilního indexu (popř. cerebroplacentárního indexu) a skupinou pacientek s patologickou hodnotou pulzatilního indexu (popř. cerebroplacentárního indexu). Rozdíly v hladinách miRNA u pacientek s fyziologickou a patologickou hodnotou indexu nebyly statisticky signifikantní ani u jednoho z analyzovaných parametrů. Následně jsem provedla korelační analýzu číselných hodnot indexů a hladin miRNA. V případě *a. umbilicalis* nebyl nalezen vztah mezi PI a hladinami miRNA v mateřské cirkulaci. V případě *a. cerebri*

media byla nalezena slabá negativní korelace mezi PI a koncentrací placentárně specifických miR-516-5p, miR-517*, miR-520a*, miR-525 a miR-526a. Slabá negativní korelace byla pozorována také v případě let-7d. Porovnání PI v *a. cerebri media* s genovou expresí miRNA potvrdilo slabou negativní korelaci u výše uvedených placentárně specifických miRNA, v případě let-7d vztah potvrzen nebyl. Platí tedy, že vyšší hladina pěti uvedených miRNA v mateřské cirkulaci souvisí s nižší hodnotou PI v *a. cerebri media*. Korelační analýza cerebroplacentárního indexu a koncentrace miRNA našla vztah slabé negativní korelace u miR-526a. Při následné analýze genové exprese byla negativní korelace potvrzena v případě miR-526a a navíc byl identifikován vztah slabé negativní korelace i u miR-520a*. Stejně jako v předchozím případě platí, že vážnější nález z ultrazvukového vyšetření koreluje s vyšší hladinou miRNA v krvi matky.

Jedním z cílů diplomové práce bylo určit, zda mají placentárně specifické miRNA potenciál predikovat pozdější výskyt těhotenských komplikací. Vzhledem k tomu, že sběr biologického materiálu do prospektivní studie je dlouhodobou záležitostí, nebylo prozatím možné data statisticky zpracovat.

Na základě uvedených výsledků se zdá pravděpodobné, že některé z placentárně specifických miRNA se uplatňují v patogenezi těhotenských komplikací. U pacientek s preeklampií jsem odhalila zvýšenou koncentraci i genovou expresi extracelulárních miR-517*, miR-520a* a miR-525 v plazmě. Zvýšené hladiny miRNA byly pozorovány v momentě klinické manifestace onemocnění a předmětem dalšího zkoumání bude analýza stejných miRNA v prvním a druhém trimestru těhotenství. Teprve tehdy budeme moci zhodnotit jejich prediktivní potenciál. Každá miRNA je schopna regulovat expresi mnoha genů (zpravidla v řádech tisíců), pro bližší určení jejich funkce v patogenezi onemocnění bude nutné použít některé z dalších metod molekulární biologie.

Literatura

1. AbdAlla S, Lothar H, el Massiery A, and Quitterer U. 2001. Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med* 7(9):1003-1009.
2. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M et al. 2003. A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9(3):277-279.
3. Apps R, Murphy SP, Fernando R, Gardner L, Ahad T, and Moffett A. 2009. Human leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-HLA antibodies. *Immunology* 127(1):26-39.
4. Araldi E, and Schipani E. 2010. MicroRNA-140 and the silencing of osteoarthritis. *Genes Dev* 24(11):1075-1080.
5. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL et al. 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(12):5003-5008.
6. Baschat AA. Fetal growth disorders. Citováno podle: Sankaran S, and Kyle PM. 2009. Aetiology and pathogenesis of IUGR. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 23(6):765-777.
7. Bauer R, Walter B, Brust P, Füchtner F, and Zwiener U. 2003. Impact of asymmetric intrauterine growth restriction on organ function in newborn piglets. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 110 Suppl 1:S40-49.
8. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E et al. 2005. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 37(7):766-770.
9. Bohnsack MT, Czaplinski K, and Gorlich D. 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10(2):185-191.
10. Borchert GM, Lanier W, and Davidson BL. 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13(12):1097-1101.
11. Bortolin-Cavaillé ML, Dance M, Weber M, and Cavaillé J. 2009. C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts. *Nucleic Acids Res* 37(10):3464-3473.
12. Breeze AC, and Lees CC. 2007. Prediction and perinatal outcomes of fetal growth restriction. *Semin Fetal Neonatal Med* 12(5):383-397.
13. Bulletins--Obstetrics ACoP. 2002. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *Obstet Gynecol* 99(1):159-167.
14. Cai X, Hagedorn CH, and Cullen BR. 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10(12):1957-1966.
15. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K et al. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24):15524-15529.
16. Campbell S, and Thoms A. 1977. Ultrasound measurement of the fetal head to abdomen circumference ratio in the assessment of growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol* 84(3):165-174.
17. Camps C, Buffa FM, Colella S, Moore J, Sotiriou C, Sheldon H, Harris AL, Gleadow JM, and

- Ragoussis J. 2008. hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clin Cancer Res* 14(5):1340-1348.
18. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H et al. 2001. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 7(5):575-583.
 19. Carr DB, Epplein M, Johnson CO, Easterling TR, and Critchlow CW. 2005. A sister's risk: family history as a predictor of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 193(3 Pt 2):965-972.
 20. Cervera R, Font J, Carmona F, and Balasch J. 2002. Pregnancy outcome in systemic lupus erythematosus: good news for the new millennium. *Autoimmun Rev* 1(6):354-359.
 21. Clark DE, Smith SK, He Y, Day KA, Licence DR, Corps AN, Lammoglia R, and Charnock-Jones DS. 1998. A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol Reprod* 59(6):1540-1548.
 22. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S, and Schroen B. 2010. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 3(6):499-506.
 23. Costa JM, Benachi A, Gautier E, Jouannic JM, Ernault P, and Dumez Y. 2002. [First trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR]. *Gynecol Obstet Fertil* 30(12):953-957.
 24. Davoren PA, McNeill RE, Lowery AJ, Kerin MJ, and Miller N. 2008. Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer. *BMC Mol Biol* 9:76.
 25. Ebbing C, Rasmussen S, and Kiserud T. 2007. Middle cerebral artery blood flow velocities and pulsatility index and the cerebroplacental pulsatility ratio: longitudinal reference ranges and terms for serial measurements. *Ultrasound Obstet Gynecol* 30(3):287-296.
 26. England LJ, Levine RJ, Qian C, Morris CD, Sibai BM, Catalano PM, Curet LB, and Klebanoff MA. 2002. Smoking before pregnancy and risk of gestational hypertension and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 186(5):1035-1040.
 27. Enquobahrie DA, Abetew DF, Sorensen TK, Willoughby D, Chidambaram K, and Williams MA. 2011. Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 204(2):178.e112-121.
 28. Faller M, Toso D, Matsunaga M, Atanasov I, Senturia R, Chen Y, Zhou ZH, and Guo F. 2010. DGCR8 recognizes primary transcripts of microRNAs through highly cooperative binding and formation of higher-order structures. *RNA* 16(8):1570-1583.
 29. Fenstad MH, Johnson MP, Løset M, Mundal SB, Roten LT, Eide IP, Bjørge L, Sande RK, Johansson AK, Dyer TD et al. 2010. STOX2 but not STOX1 is differentially expressed in decidua from pre-eclamptic women: data from the Second Nord-Trøndelag Health Study. *Mol Hum Reprod* 16(12):960-968.
 30. Fitzpatrick E, Johnson MP, Dyer TD, Forrest S, Elliott K, Blangero J, Brennecke SP, and Moses EK. 2009. Genetic association of the activin A receptor gene (ACVR2A) and pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 15(3):195-204.
 31. Frøen JF, Gardosi JO, Thurmann A, Francis A, and Stray-Pedersen B. 2004. Restricted fetal growth in sudden intrauterine unexplained death. *Acta Obstet Gynecol Scand* 83(9):801-807.
 32. Gardosi J, Chang A, Kalyan B, Sahota D, and Symonds EM. 1992. Customised antenatal growth charts. *Lancet* 339(8788):283-287.
 33. Giguère Y, Charland M, Bujold E, Bernard N, Grenier S, Rousseau F, Lafond J, Légaré F,

- and Forest JC. 2010. Combining biochemical and ultrasonographic markers in predicting preeclampsia: a systematic review. *Clin Chem* 56(3):361-375.
34. Gilad S, Meiri E, Yogeve Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholak H, Melamed N et al. . 2008. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 3(9):e3148.
 35. Gramellini D, Folli MC, Raboni S, Vadora E, and Merialdi A. 1992. Cerebral-umbilical Doppler ratio as a predictor of adverse perinatal outcome. *Obstet Gynecol* 79(3):416-420.
 36. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, and Enright AJ. 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34(Database issue):D140-144.
 37. Gunel T, Zeybek YG, Akçakaya P, Kalelioğlu I, Benian A, Ermis H, and Aydın K. 2011. Serum microRNA expression in pregnancies with preeclampsia. *Genet Mol Res* 10(4):4034-4040.
 38. Gynecologists ACoOa. 2013. ACOG Practice bulletin no. 134: fetal growth restriction. *Obstet Gynecol* 121(5):1122-1133.
 39. Hadlock FP, Deter RL, Harrist RB, Roecker E, and Park SK. 1983. A date-independent predictor of intrauterine growth retardation: femur length/abdominal circumference ratio. *AJR Am J Roentgenol* 141(5):979-984.
 40. Hanke M, Hoefig K, Merz H, Feller AC, Kausch I, Jocham D, Warnecke JM, and Sczakiel G. 2010. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol* 28(6):655-661.
 41. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, and Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6(10):986-994.
 42. Heneghan HM, Miller N, Kelly R, Newell J, and Kerin MJ. 2010. Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease. *Oncologist* 15(7):673-682.
 43. Hiby SE, Apps R, Sharkey AM, Farrell LE, Gardner L, Mulder A, Claas FH, Walker JJ, Redman CW, Redman CC et al. 2010. Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J Clin Invest* 120(11):4102-4110.
 44. Higashijima A, Miura K, Mishima H, Kinoshita A, Jo O, Abe S, Hasegawa Y, Miura S, Yamasaki K, Yoshida A et al. 2013. Characterization of placenta-specific microRNAs in fetal growth restriction pregnancy. *Prenat Diagn* 33(3):214-222.
 45. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, and Griffith R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10(4):413-417.
 46. Hirtenlehner K, Pollheimer J, Lichtenberger C, Wolschek MF, Zeisler H, Husslein P, and Knöfler M. 2003. Elevated serum concentrations of the angiogenesis inhibitor endostatin in preeclamptic women. *J Soc Gynecol Investig* 10(7):412-417.
 47. Holland PM, Abramson RD, Watson R, and Gelfand DH. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(16):7276-7280.
 48. Hristov M, Erl W, Linder S, and Weber PC. 2004. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 104(9):2761-2766.
 49. Hromadnikova I, Kotlabova K, Doucha J, Dlouha K, and Krofta L. 2012. Absolute and relative quantification of placenta-specific micrornas in maternal circulation with placental insufficiency-related complications. *J Mol Diagn* 14(2):160-167.
 50. Hu Y, Li P, Hao S, Liu L, Zhao J, and Hou Y. 2009. Differential expression of microRNAs

- in the placentae of Chinese patients with severe pre-eclampsia. *Clin Chem Lab Med* 47(8):923-929.
51. Hu Y, Liu CM, Qi L, He TZ, Shi-Guo L, Hao CJ, Cui Y, Zhang N, Xia HF, and Ma X. 2011. Two common SNPs in pri-miR-125a alter the mature miRNA expression and associate with recurrent pregnancy loss in a Han-Chinese population. *RNA Biol* 8(5):861-872.
 52. Hutvagner G, and Zamore PD. 2002. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297(5589):2056-2060.
 53. Chaiworapongsa T, Romero R, Espinoza J, Bujold E, Mee Kim Y, Gonçalves LF, Gomez R, and Edwin S. 2004. Evidence supporting a role for blockade of the vascular endothelial growth factor system in the pathophysiology of preeclampsia. Young Investigator Award. *Am J Obstet Gynecol* 190(6):1541-1547; discussion 1547-1550.
 54. Chavez MR, Ananth CV, Smulian JC, and Vintzileos AM. 2007. Fetal transcerebellar diameter measurement for prediction of gestational age at the extremes of fetal growth. *J Ultrasound Med* 26(9):1167-1171; quiz 1173-1164.
 55. Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, and Lo YM. 2008. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem* 54(3):482-490.
 56. Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DH, and Lo YM. 2002. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet* 360(9338):998-1000.
 57. Chumbley G, King A, Robertson K, Holmes N, and Loke YW. 1994. Resistance of HLA-G and HLA-A2 transfectants to lysis by decidual NK cells. *Cell Immunol* 155(2):312-322.
 58. Ishibashi O, Ohkuchi A, Ali MM, Kurashina R, Luo SS, Ishikawa T, Takizawa T, Hirashima C, Takahashi K, Migita M et al. 2012. Hydroxysteroid (17- β) dehydrogenase 1 is dysregulated by miR-210 and miR-518c that are aberrantly expressed in preeclamptic placentas: a novel marker for predicting preeclampsia. *Hypertension* 59(2):265-273.
 59. Jeon YJ, Kim SY, Rah H, Choi DH, Cha SH, Yoon TK, Lee WS, Shim SH, and Kim NK. 2012. Association of the miR-146aC>G, miR-149T>C, miR-196a2T>C, and miR-499A>G polymorphisms with risk of spontaneously aborted fetuses. *Am J Reprod Immunol* 68(5):408-417.
 60. Ji F, Yang B, Peng X, Ding H, You H, and Tien P. 2011. Circulating microRNAs in hepatitis B virus-infected patients. *J Viral Hepat* 18(7):e242-251.
 61. Jones DC, and Hayslett JP. 1996. Outcome of pregnancy in women with moderate or severe renal insufficiency. *N Engl J Med* 335(4):226-232.
 62. Jurisicova A, Casper RF, MacLusky NJ, Mills GB, and Librach CL. 1996. HLA-G expression during preimplantation human embryo development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(1):161-165.
 63. Kang K, Zhang X, Liu H, Wang Z, Zhong J, Huang Z, Peng X, Zeng Y, Wang Y, Yang Y et al. . 2012. A novel real-time PCR assay of microRNAs using S-Poly(T), a specific oligo(dT) reverse transcription primer with excellent sensitivity and specificity. *PLoS One* 7(11):e48536.
 64. Khan F, Belch JJ, MacLeod M, and Mires G. 2005. Changes in endothelial function precede the clinical disease in women in whom preeclampsia develops. *Hypertension* 46(5):1123-1128.
 65. Khvorova A, Reynolds A, and Jayasena SD. 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115(2):209-216.
 66. Klonoff-Cohen HS, Savitz DA, Cefalo RC, and McCann MF. 1989. An epidemiologic study of contraception and preeclampsia. *JAMA* 262(22):3143-3147.
 67. Kosaka N, Iguchi H, and Ochiya T. 2010. Circulating microRNA in body fluid: a new

- potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci* 101(10):2087-2092.
68. Kotlabova K, Doucha J, and Hromadnikova I. 2011. Placental-specific microRNA in maternal circulation--identification of appropriate pregnancy-associated microRNAs with diagnostic potential. *J Reprod Immunol* 89(2):185-191.
 69. Lachmeijer AM, Crusius JB, Pals G, Dekker GA, Arngrímsson R, and ten Kate LP. 2001. Polymorphisms in the tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha gene region and preeclampsia. *Obstet Gynecol* 98(4):612-619.
 70. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, and Tuschl T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294(5543):853-858.
 71. Laurent LC, Chen J, Ulitsky I, Mueller FJ, Lu C, Shamir R, Fan JB, and Loring JF. 2008. Comprehensive microRNA profiling reveals a unique human embryonic stem cell signature dominated by a single seed sequence. *Stem Cells* 26(6):1506-1516.
 72. Lee RC, Feinbaum RL, and Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75(5):843-854.
 73. Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R et al. 2006. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med* 355(10):992-1005.
 74. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH et al. 2004. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 350(7):672-683.
 75. Li QJ, Chau J, Ebert PJ, Sylvester G, Min H, Liu G, Braich R, Manoharan M, Soutschek J, Skare P et al. 2007. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell* 129(1):147-161.
 76. Liang Y, Ridzon D, Wong L, and Chen C. 2007. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 8:166.
 77. Lie RT, Rasmussen S, Brunborg H, Gjessing HK, Lie-Nielsen E, and Irgens LM. 1998. Fetal and maternal contributions to risk of pre-eclampsia: population based study. *BMJ* 316(7141):1343-1347.
 78. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, and Deetz K. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4(6):357-362.
 79. Livak KJ, and Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402-408.
 80. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, and Wainscoat JS. 1997. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350(9076):485-487.
 81. Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, Poon PM, Redman CW, and Wainscoat JS. 1998. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 339(24):1734-1738.
 82. Luo SS, Ishibashi O, Ishikawa G, Ishikawa T, Katayama A, Mishima T, Takizawa T, Shigihara T, Goto T, Izumi A et al. 2009. Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes. *Biol Reprod* 81(4):717-729.
 83. Maccani MA, Padbury JF, and Marsit CJ. 2011. miR-16 and miR-21 expression in the placenta is associated with fetal growth. *PLoS One* 6(6):e21210.
 84. Magann EF, and Martin JN. 1999. Twelve steps to optimal management of HELLP syndrome. *Clin Obstet Gynecol* 42(3):532-550.
 85. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP,

- Sellke FW, Stillman IE et al. 2003. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 111(5):649-658.
86. Mayor-Lynn K, Toloubeydokhti T, Cruz AC, and Chegini N. 2011. Expression profile of microRNAs and mRNAs in human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm labor. *Reprod Sci* 18(1):46-56.
 87. Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, and van Asshe A. 1994. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 101(8):669-674.
 88. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, and Vandesompele J. 2009. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* 10(6):R64.
 89. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A et al. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(30):10513-10518.
 90. Miura K, Miura S, Yamasaki K, Higashijima A, Kinoshita A, Yoshiura K, and Masuzaki H. 2010. Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem* 56(11):1767-1771.
 91. Morales-Prieto DM, Chaiwangyen W, Ospina-Prieto S, Schneider U, Herrmann J, Gruhn B, and Markert UR. 2012. MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. *Placenta* 33(9):725-734.
 92. Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, Carosella ED, and Paul P. 1999. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 11(5):803-811.
 93. Moses EK, Lade JA, Guo G, Wilton AN, Grehan M, Freed K, Borg A, Terwilliger JD, North R, Cooper DW et al. 2000. A genome scan in families from Australia and New Zealand confirms the presence of a maternal susceptibility locus for pre-eclampsia, on chromosome 2. *Am J Hum Genet* 67(6):1581-1585.
 94. Mouillet JF, Chu T, Hubel CA, Nelson DM, Parks WT, and Sadovsky Y. 2010a. The levels of hypoxia-regulated microRNAs in plasma of pregnant women with fetal growth restriction. *Placenta* 31(9):781-784.
 95. Mouillet JF, Chu T, Nelson DM, Mishima T, and Sadovsky Y. 2010b. MiR-205 silences MED1 in hypoxic primary human trophoblasts. *FASEB J* 24(6):2030-2039.
 96. Mullis KB, and Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.
 97. Ng EK, Tsui NB, Lau TK, Leung TN, Chiu RW, Panesar NS, Lit LC, Chan KW, and Lo YM. 2003. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(8):4748-4753.
 98. Nicolaides KH, Bilardo CM, Soothill PW, and Campbell S. 1988. Absence of end diastolic frequencies in umbilical artery: a sign of fetal hypoxia and acidosis. *BMJ* 297(6655):1026-1027.
 99. Noguer-Dance M, Abu-Amro S, Al-Khtib M, Lefèvre A, Coullin P, Moore GE, and Cavaillé J. 2010. The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta. *Hum Mol Genet* 19(18):3566-3582.
 100. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, and Lai EC. 2007. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 130(1):89-100.
 101. Ong KK, Preece MA, Emmett PM, Ahmed ML, Dunger DB, and Team AS. 2002. Size at

- birth and early childhood growth in relation to maternal smoking, parity and infant breast-feeding: longitudinal birth cohort study and analysis. *Pediatr Res* 52(6):863-867.
102. Parra-Cordero M, Lees C, Missfelder-Lobos H, Seed P, and Harris C. 2007. Fetal arterial and venous Doppler pulsatility index and time averaged velocity ranges. *Prenat Diagn* 27(13):1251-1257.
 103. Peltier HJ, and Latham GJ. 2008. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 14(5):844-852.
 104. Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, Kim DJ, Hearn SA, Danforth D, Hastings ML, and Duelli DM. 2010. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One* 5(10):e13515.
 105. Pineles BL, Romero R, Montenegro D, Tarca AL, Han YM, Kim YM, Draghici S, Espinoza J, Kusanovic JP, Mittal P et al. 2007. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 196(3):261.e261-266.
 106. Prokopi M, Pula G, Mayr U, Devue C, Gallagher J, Xiao Q, Boulanger CM, Westwood N, Urbich C, Willeit J et al. 2009. Proteomic analysis reveals presence of platelet microparticles in endothelial progenitor cell cultures. *Blood* 114(3):723-732.
 107. Rajakumar A, Brandon HM, Daftary A, Ness R, and Conrad KP. 2004. Evidence for the functional activity of hypoxia-inducible transcription factors overexpressed in preeclamptic placentae. *Placenta* 25(10):763-769.
 108. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, and Ruvkun G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403(6772):901-906.
 109. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. 2000. *Am J Obstet Gynecol* 183(1):S1-S22.
 110. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, and Bradley A. 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14(10A):1902-1910.
 111. Roten LT, Johnson MP, Forsmo S, Fitzpatrick E, Dyer TD, Brennecke SP, Blangero J, Moses EK, and Austgulen R. 2009. Association between the candidate susceptibility gene ACVR2A on chromosome 2q22 and pre-eclampsia in a large Norwegian population-based study (the HUNT study). *Eur J Hum Genet* 17(2):250-257.
 112. Ruby JG, Jan CH, and Bartel DP. 2007. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448(7149):83-86.
 113. Saini HK, Griffiths-Jones S, and Enright AJ. 2007. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(45):17719-17724.
 114. Schreuder AM, McDonnell M, Gaffney G, Johnson A, and Hope PL. 2002. Outcome at school age following antenatal detection of absent or reversed end diastolic flow velocity in the umbilical artery. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 86(2):F108-114.
 115. Seitz H, Royo H, Bortolin ML, Lin SP, Ferguson-Smith AC, and Cavaillé J. 2004. A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse *Dlk1-Gtl2* domain. *Genome Res* 14(9):1741-1748.
 116. Shembrey MA, and Noble AD. 1995. An instructive case of abdominal pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 35(2):220-221.
 117. Sibai BM. 1990. The HELLP syndrome (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets): much ado about nothing? *Am J Obstet Gynecol* 162(2):311-316.
 118. Sibai BM. 2002. Chronic hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol* 100(2):369-377.

119. Sitras V, Paulssen RH, Grønaas H, Leirvik J, Hanssen TA, Vårtun A, and Acharya G. 2009. Differential placental gene expression in severe preeclampsia. *Placenta* 30(5):424-433.
120. Smith GC, Smith MF, McNay MB, and Fleming JE. 1997. The relation between fetal abdominal circumference and birthweight: findings in 3512 pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 104(2):186-190.
121. Snider JV, Wechsler MA, and Lossos IS. 2001. Human disease characterization: real-time quantitative PCR analysis of gene expression. *Drug Discov Today* 6(20):1062-1067.
122. Spencer K, Yu CK, Cowans NJ, Otiqbah C, and Nicolaides KH. 2005. Prediction of pregnancy complications by first-trimester maternal serum PAPP-A and free beta-hCG and with second-trimester uterine artery Doppler. *Prenat Diagn* 25(10):949-953.
123. Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D, Cosgrove D, Kieran M, Sudhakar A, and Kalluri R. 2003. Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. *J Biol Chem* 278(15):12605-12608.
124. Tsai KW, Kao HW, Chen HC, Chen SJ, and Lin WC. 2009. Epigenetic control of the expression of a primate-specific microRNA cluster in human cancer cells. *Epigenetics* 4(8):587-592.
125. Tubbergen P, Lachmeijer AM, Althuisius SM, Vlak ME, van Geijn HP, and Dekker GA. 1999. Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparous women? *J Reprod Immunol* 45(1):81-88.
126. Tuffnell DJ, Jankowicz D, Lindow SW, Lyons G, Mason GC, Russell IF, Walker JJ, and Group YOCC. 2005. Outcomes of severe pre-eclampsia/eclampsia in Yorkshire 1999/2003. *BJOG* 112(7):875-880.
127. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, and Lötvall JO. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9(6):654-659.
128. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, and Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7):RESEARCH0034.
129. Vasudevan S, Tong Y, and Steitz JA. 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318(5858):1931-1934.
130. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, and Remaley AT. 2011. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 13(4):423-433.
131. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, and Galas DJ. 2010. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 38(20):7248-7259.
132. Wang KG, Chen CY, and Chen YY. 2009. The effects of absent or reversed end-diastolic umbilical artery Doppler flow velocity. *Taiwan J Obstet Gynecol* 48(3):225-231.
133. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, and Olson EN. 2008. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell* 15(2):261-271.
134. Wei J, Gao W, Zhu CJ, Liu YQ, Mei Z, Cheng T, and Shu YQ. 2011. Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *Chin J Cancer* 30(6):407-414.
135. Weinstein L. 1982. Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: a severe consequence of hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 142(2):159-167.
136. Whitworth JA, and World Health Organization ItSoHWG. 2003. 2003 World Health

- Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens* 21(11):1983-1992.
137. Wimalasundera RC, Larbalestier N, Smith JH, de Ruiter A, McG Thom SA, Hughes AD, Poulter N, Regan L, and Taylor GP. 2002. Pre-eclampsia, antiretroviral therapy, and immune reconstitution. *Lancet* 360(9340):1152-1154.
 138. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, and Diederichs S. 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11(3):228-234.
 139. Wu L, Zhou H, Lin H, Qi J, Zhu C, Gao Z, and Wang H. 2012. Circulating microRNAs are elevated in plasma from severe preeclamptic pregnancies. *Reproduction* 143(3):389-397.
 140. Xia Y, Wen H, Bobst S, Day MC, and Kellems RE. 2003. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human trophoblast cells. *J Soc Gynecol Investig* 10(2):82-93.
 141. Yang Q, Lu J, Wang S, Li H, Ge Q, and Lu Z. 2011. Application of next-generation sequencing technology to profile the circulating microRNAs in the serum of preeclampsia versus normal pregnant women. *Clin Chim Acta* 412(23-24):2167-2173.
 142. Yi R, Qin Y, Macara IG, and Cullen BR. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17(24):3011-3016.
 143. Yie SM, Li LH, Li YM, and Librach C. 2004. HLA-G protein concentrations in maternal serum and placental tissue are decreased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 191(2):525-529.
 144. Yuan X, Liu C, Yang P, He S, Liao Q, Kang S, and Zhao Y. 2009. Clustered microRNAs' coordination in regulating protein-protein interaction network. *BMC Syst Biol* 3:65.
 145. Zanchetti A. 2003. Costs of implementing recommendations on hypertension management given in recent guidelines. *J Hypertens* 21(12):2207-2209.
 146. Zhang Y, Fei M, Xue G, Zhou Q, Jia Y, Li L, Xin H, and Sun S. 2012. Elevated levels of hypoxia-inducible microRNA-210 in pre-eclampsia: new insights into molecular mechanisms for the disease. *J Cell Mol Med* 16(2):249-259.
 147. Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, Sun F, Lu J, Yin Y, Cai X et al. . 2010. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell* 39(1):133-144.
 148. Zhao C, Dong J, Jiang T, Shi Z, Yu B, Zhu Y, Chen D, Xu J, Huo R, Dai J et al. . 2011. Early second-trimester serum miRNA profiling predicts gestational diabetes mellitus. *PLoS One* 6(8):e23925.
 149. Zhao Z, Zhao Q, Warrick J, Lockwood CM, Woodworth A, Moley KH, and Gronowski AM. 2012. Circulating microRNA miR-323-3p as a biomarker of ectopic pregnancy. *Clin Chem* 58(5):896-905.
 150. Zhou CC, Zhang Y, Irani RA, Zhang H, Mi T, Popek EJ, Hicks MJ, Ramin SM, Kellems RE, and Xia Y. 2008. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nat Med* 14(8):855-862.
 151. Zhou Y, Damsky CH, and Fisher SJ. 1997. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest* 99(9):2152-2164.
 152. Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, Alitalo K, Damsky C, and Fisher SJ. 2002. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol* 160(4):1405-1423.

153. Zhu XM, Han T, Sargent IL, Yin GW, and Yao YQ. 2009. Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 200(6):661.e661-667.

Internetové zdroje

1. Asuragen, Inc. [online]. [cit. 2013-08-14]. Dostupné z: http://www.asuragenservices.com/Services/services/miRNA_expression/taqman_mirna.aspx
2. MicroRNA.org - Targets and Expression [online]. [cit. 2013-08-14]. Dostupné z: <http://www.microrna.org/microrna/home.do>
3. MiRBase: the microRNA database [online]. [cit. 2013-08-15]. Dostupné z: <http://mirbase.org/>
4. WARDLAW, Tessa M. *Low birthweight: country, regional and global estimates* [online]. New York: UNICEF, 2004, 27 p. [cit. 2013-08-14]. ISBN 92-806-3832-7.
5. World Health Organization. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision* [online]. 2010 [cit. 2013-08-15]. Dostupné z: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en>

Příloha 1: Tabulky

Tabulka P1 Porovnání koncentrace extracelulárních miRNA u pacientek s fyziologickým průběhem gravidity a pacientek s těhotenskými komplikacemi – výsledky testu ANOVA

Porovnání koncentrace extracelulárních miRNA u pacientek s fyziologickým průběhem gravidity a pacientek s těhotenskými komplikacemi					
miRNA	F	df	p	síla testu (%)	95% interval spolehlivosti
miR-16	1,6200	1,162	0,205	24,43	(-434 356; 93 881,67)
let-7d	0,0815	1,162	0,776	5,93	(-74 310; 55 541,64)
miR-516-5p	3,8963	1,162	0,050	50,09	(-567,1; 0,116 503)
miR-517*	5,4831	1,162	0,020	64,35	(-109,023; -9,266 76)
miR-518b	4,5348	1,162	0,035	56,24	(-210,041; -7,921 99)
miR-520a*	5,9963	1,162	0,015	68,23	(-189,319; -20,287 6)
miR-520h	1,5243	1,162	0,219	23,26	(-94,418 4; 21,773 56)
miR-525	7,8375	1,162	0,006	79,47	(-302,159; 52,203 3)
miR-526a	4,6261	1,162	0,033	57,07	(-443,390; -18,9172)

Tabulka P2 Porovnání genové exprese extracelulárních miRNA u pacientek s fyziologickým průběhem gravidity a pacientek s těhotenskými komplikacemi – výsledky testu ANOVA

Porovnání genové exprese extracelulárních miRNA u pacientek s fyziologickým průběhem gravidity a pacientek s těhotenskými komplikacemi					
miRNA	F	df	p	síla testu (%)	95% interval spolehlivosti
miR-16	1,2234	1,162	0,270	19,59	(-263 623; 0,074 329)
let-7d	0,0150	1,162	0,903	5,17	(-0,036 751; 0,032 466)
miR-516-5p	3,0695	1,162	0,082	41,37	(-0,000 016; 0,000 001)
miR-517*	5,8996	1,162	0,016	67,53	(-0,000 049; -0,000 005)
miR-518b	2,4769	1,162	0,118	34,65	(-0,000 09; 0,000 01)
miR-520a*	6,5141	1,162	0,012	71,81	(-0,000 045; -0,000 006)
miR-520h	0,9823	1,162	0,323	16,65	(-0,000 037; 0,000 012)
miR-525	7,1426	1,162	0,008	75,7	(-0,000 128; 0,000 019)
miR-526a	3,3703	1,162	0,068	44,64	(-0,000 15; 0,000 005)

Tabulka P3 Porovnání koncentrace extracelulárních miRNA u pacientek s fyziologickým průběhem gravidity a pacientek s preeklampií, fetální růstovou retardací a gestační hypertenzí – výsledky testu ANOVA

Porovnání koncentrace extracelulárních miRNA u pacientek s fyziologickým průběhem gravidity a pacientek s preeklampií, fetální růstovou retardací a gestační hypertenzí							
miRNA	F	df	p	síla testu (%)	post-hoc analýza	p	95% interval spolehlivosti
miR-16	0,7409	3,160	0,530	20,6	FG vs. PE ± FGR	1,000	(-529 006; 262 673,3)
					FG vs. FGR	0,946	(-772 002; 236 097,7)
					FG vs. GH	1,000	(-696 141; 369 134,2)
let-7d	2,0488	3,160	0,110	51,8	FG vs. PE ± FGR	1,000	(-103 934; 139 633,1)
					FG vs. FGR	1,000	(-82 846; 108 431,8)
					FG vs. GH	0,270	(-226 032; 31 349,3)
miR-516-5p	2,5562	3,160	0,057	62,2	FG vs. PE ± FGR	0,066	(-828,279; 15,335 5)
					FG vs. FGR	1,000	(-568,859; 505,373)
					FG vs. GH	1,000	(-725,832; 409,326 4)
miR-517*	2,9099	3,160	0,036	68,5	FG vs. PE ± FGR	0,035	(-152,408; -3,540 09)
					FG vs. FGR	1,000	(-109,617; 79,946 16)
					FG vs. GH	0,994	(-152,373; 47,942 02)
miR-518b	3,1975	3,160	0,025	73,0	FG vs. PE ± FGR	0,108	(-294,056; 16,297 6)
					FG vs. FGR	1,000	(-205,527; 189,667 7)
					FG vs. GH	0,126	(-391,130; 26,479 2)
miR-520a*	3,6103	3,160	0,015	78,7	FG vs. PE ± FGR	0,011	(-273,778; -23,425 9)
					FG vs. FGR	1,000	(-206,129; 112,661 4)
					FG vs. GH	1,000	(-204,883; 131,987 4)
miR-520h	1,2889	3,160	0,280	34,0	FG vs. PE ± FGR	0,744	(-137,235; 36,601 8)
					FG vs. FGR	1,000	(-101,493; 119,865 4)
					FG vs. GH	1,000	(-166,692; 67,221 6)
miR-525	3,4917	3,160	0,017	77,1	FG vs. PE ± FGR	0,009	(-411,322; -38,443 5)
					FG vs. FGR	1,000	(-336,584; 138,227 4)
					FG vs. GH	1,000	(-352,044; 149,697 3)
miR-526a	2,3446	3,160	0,075	58,1	FG vs. PE ± FGR	0,060	(-626,861; 7,524 4)
					FG vs. FGR	1,000	(-500,603; 304,183 6)
					FG vs. GH	1,000	(-568,766; 281,664 7)

Tabulka P4 Porovnání genové exprese extracelulárních miRNA u pacientek s fyziologickým průběhem gravidity a pacientek s preeklampií, fetální růstovou retardací a gestační hypertenzí – výsledky testu ANOVA

Porovnání genové exprese extracelulárních miRNA u pacientek s fyziologickým průběhem gravidity a pacientek s preeklampií, fetální růstovou retardací a gestační hypertenzí							
miRNA	F	df	p	síla testu (%)	post-hoc analýza	p	95% interval spolehlivosti
miR-16	0,5939	3,160	0,620	17,2	FG vs. PE ± FGR	1,000	(-0,334 293; 0,172 224)
					FG vs. FGR	1,000	(-0,478 142; 0,166 841)
					FG vs. GH + EH	1,000	(-0,402 701; 0,278 863)
let-7d	1,8464	3,160	0,141	44,2	FG vs. PE ± FGR	1,000	(-0,044 302; 0,057 835)
					FG vs. FGR	1,000	(-0,047 998; 0,082 060)
					FG vs. GH + EH	0,449	(-0,114 846; 0,022 588)
miR-516-5p	1,8502	3,160	0,140	47,4	FG vs. PE ± FGR	0,168	(-0,000 023; 0,000 002)
					FG vs. FGR	1,000	(-0,000 017; 0,000 015)
					FG vs. GH + EH	1,000	(-0,000 021; 0,000 012)
miR-517*	2,7420	3,160	0,045	65,6	FG vs. PE ± FGR	0,047	(-0,000 065; 0,000 000)
					FG vs. FGR	1,000	(-0,000 051; 0,000 032)
					FG vs. GH + EH	0,558	(-0,000 072; 0,000 016)
miR-518b	2,1810	3,160	0,092	54,7	FG vs. PE ± FGR	0,583	(-0,000 121; 0,000 028)
					FG vs. FGR	1,000	(-0,000 093; 0,000 098)
					FG vs. GH + EH	0,223	(-0,000 180; 0,000 021)
miR-520a*	3,3697	3,160	0,020	75,5	FG vs. PE ± FGR	0,013	(-0,000 064; -0,000 005)
					FG vs. FGR	1,000	(-0,000 049; 0,000 025)
					FG vs. GH + EH	1,000	(-0,000 052; 0,000 027)
miR-520h	0,9366	3,160	0,424	25,3	FG vs. PE ± FGR	1,000	(-0,000 053; 0,000 022)
					FG vs. FGR	1,000	(-0,000 043; 0,000 051)
					FG vs. GH + EH	1,000	(-0,000 073; -0,000 027)
miR-525	3,3359	3,160	0,021	75,0	FG vs. PE ± FGR	0,012	(-0,000 175; -0,000 014)
					FG vs. FGR	1,000	(-0,000 137; 0,000 069)
					FG vs. GH + EH	1,000	(-0,000 156; 0,000 061)
miR-526a	1,7148	3,160	0,166	44,2	FG vs. PE ± FGR	0,192	(-0,000 210; 0,000 022)
					FG vs. FGR	1,000	(-0,000 167; 0,000 128)
					FG vs. GH + EH	1,000	(-0,000 217; 0,000 095)

Tabulka P5 Koncentrace extracelulárních miRNA ve vztahu k závažnosti preeklampsie – výsledky vícefaktorové analýzy ANOVA

Koncentrace extracelulárních miRNA ve vztahu k závažnosti preeklampsie					
		F	df	p	síla testu (%)
miR-16	F	0,0320	1,59	0,859	5,3
	F1	2,2112	1,59	0,142	30,9
	F2	1,6941	1,59	0,198	24,9
let-7d	F	0,0034	1,59	0,953	5,0
	F1	1,0735	1,59	0,304	17,5
	F2	1,7374	1,59	0,192	25,4
miR-516-5p	F	0,1189	1,59	0,731	6,3
	F1	1,2183	1,59	0,274	19,2
	F2	1,5006	1,59	0,225	22,6
miR-517*	F	0,0916	1,59	0,763	6,0
	F1	1,0771	1,59	0,304	17,5
	F2	0,1487	1,59	0,701	6,7
miR-518b	F	0,0168	1,59	0,897	5,2
	F1	1,9851	1,59	0,164	28,3
	F2	1,2894	1,59	0,261	20,1
miR-520a*	F	0,5437	1,59	0,464	11,2
	F1	1,3159	1,59	0,256	20,4
	F2	1,5221	1,59	0,222	22,9
miR-520h	F	0,2007	1,59	0,656	7,3
	F1	2,0808	1,59	0,154	29,5
	F2	1,4829	1,59	0,228	22,4
miR-525	F	0,0274	1,59	0,869	5,3
	F1	1,2646	1,59	0,265	19,8
	F2	1,7956	1,59	0,185	26,1
miR-526a	F	0,1210	1,59	0,729	5,3
	F1	1,5292	1,59	0,221	19,8
	F2	1,1600	1,59	0,286	26,1

F1 klinická závažnost PE (mírná nebo závažná PE)

F2 závažnost PE podle gestačního týdne ukončení gravidity (před nebo po 34. týdnu těhotenství)

Tabulka P6 Genová exprese extracelulárních miRNA ve vztahu k závažnosti preeklampsie – výsledky vícefaktorové analýzy ANOVA

Genová exprese extracelulárních miRNA ve vztahu k závažnosti preeklampsie					
		F	df	p	síla testu (%)
miR-16	F	0,0140	1,59	0,906	5,2
	F1	0,7172	1,59	0,400	13,3
	F2	1,3444	1,59	0,250	20,7
let-7d	F	0,0101	1,59	0,920	5,1
	F1	0,5948	1,59	0,444	11,8
	F2	1,3057	1,59	0,258	20,3
miR-516-5p	F	0,2747	1,59	0,602	8,1
	F1	0,7210	1,59	0,399	13,3
	F2	1,8449	1,59	0,180	26,7
miR-517*	F	0,1668	1,59	0,684	6,9
	F1	0,2631	1,59	0,610	8,0
	F2	0,0726	1,59	0,789	5,8
miR-518b	F	0,0146	1,59	0,904	5,2
	F1	1,1631	1,59	0,285	18,6
	F2	1,4735	1,59	0,230	22,3
miR-520a*	F	0,9759	1,59	0,327	16,3
	F1	0,5145	1,59	0,476	10,9
	F2	1,1409	1,59	0,290	18,3
miR-520h	F	0,2791	1,59	0,599	8,2
	F1	1,7648	1,59	0,189	25,7
	F2	1,7571	1,59	0,190	25,7
miR-525	F	0,0131	1,59	0,909	5,2
	F1	0,6478	1,59	0,424	12,4
	F2	1,8797	1,59	0,176	27,1
miR-526a	F	0,3516	1,59	0,555	9,0
	F1	0,9843	1,59	0,325	16,4
	F2	1,2019	1,59	0,277	19,6

F1 klinická závažnost PE (mírná vs závažná)

F2 závažnost PE podle gestačního týdne ukončení gravidity (před nebo po 34. týdnu těhotenství)

Tabulka P7 Porovnání koncentrace extracelulárních miRNA u pacientek s PE nasedající na předchozí hypertenzi a pacientek s PE bez předchozího výskytu hypertenze – výsledky testu ANOVA

Porovnání koncentrace extracelulárních miRNA u pacientek s PE nasedající na předchozí hypertenzi a pacientek s PE bez předchozího výskytu hypertenze					
miRNA	F	df	p	síla testu (%)	95% interval spolehlivosti
miR-16	0,3518	1,61	0,555	9,0	(-343 923; 188 197,3)
let-7d	0,4883	1,61	0,488	10,6	(-24 929,0; 12 017,72)
miR-516-5p	0,5131	1,61	0,477	10,9	(-869,300; 410,744)
miR-517*	0,1055	1,61	0,747	6,2	(-102,984; 142,917 4)
miR-518b	1,1963	1,61	0,278	19,0	(-331,782; 97,158 01)
miR-520a*	0,2762	1,61	0,601	8,1	(-273,908; 159,896)
miR-520h	0,8209	1,61	0,369	14,4	(-175,502; 66,055 15)
miR-525	0,0000	1,61	1,000	5,0	(-292,317; 292,706 5)
miR-526a	0,4603	1,61	0,500	10,2	(-350,129; 709,522 2)

Tabulka P8 Porovnání genové exprese extracelulárních miRNA u pacientek s PE nasedající na předchozí hypertenzi a pacientek s PE bez předchozího výskytu hypertenze – výsledky testu ANOVA

Porovnání genové exprese extracelulárních miRNA u pacientek s PE nasedající na předchozí hypertenzi a pacientek s PE bez předchozího výskytu hypertenze					
miRNA	F	df	p	síla testu (%)	95% interval spolehlivosti
miR-16	0,0583	1,61	0,810	5,7	(-0,207 160; 0,162 533)
let-7d	0,1391	1,61	0,710	6,6	(-0,023 915; 0,016 396)
miR-516-5p	0,0593	1,61	0,808	5,7	(-0,000 021; 0,000 016)
miR-517*	0,2924	1,61	0,591	8,3	(-0,000 037; 0,000 064)
miR-518b	0,0286	1,61	0,866	5,3	(-0,000 103; 0,000 087)
miR-520a*	0,0770	1,61	0,782	5,9	(-0,000 057; 0,000 043)
miR-520h	0,2614	1,61	0,611	8,0	(-0,000 055; 0,000 033)
miR-525	0,2585	1,61	0,613	7,9	(-0,000 091; 0,000 153)
miR-526a	0,1653	1,61	0,686	6,9	(-0,000 155; 0,000 234)

Tabulka P9 Porovnání koncentrace extracelulárních mikroRNA u pacientek s fyziologickou a patologickou hodnotou PI v *arteria umbilicalis* – výsledky testu ANOVA

Porovnání koncentrace extracelulárních mikroRNA u pacientek s fyziologickou a patologickou hodnotou PI v <i>arteria umbilicalis</i>					
miRNA	F	df	p	síla testu (%)	95% interval spolehlivosti
miR-16	0,7493	1,69	0,390	13,7	(-292 747; 741 503,5)
let-7d	0,0255	1,69	0,509	5,3	(-16 423,9; 19 283,26)
miR-516-5p	0,0000	1,69	1,000	5,0	(-408,344; 409,332 9)
miR-517*	1,0498	1,69	0,311	17,2	(-28,535 2; 88,324 41)
miR-518b	0,7007	1,69	0,405	13,1	(-239,571; 97,947 48)
miR-520a*	0,0002	1,69	0,988	5,0	(-102,746; 101,181 5)
miR-520h	0,3708	1,69	0,545	9,2	(-103,475; 55,076 39)
miR-525	0,3722	1,69	0,544	9,2	(-124,817; 234,790 1)
miR-526a	0,4414	1,69	0,509	10,0	(-129,709; 259,178 8)

Tabulka P10 Vztah mezi koncentrací extracelulárních miRNA a pulzatilním indexem v *arteria umbilicalis* – výsledky Spearmanova korelačního koeficientu

Vztah mezi koncentrací extracelulárních miRNA a pulzatilním indexem v <i>arteria umbilicalis</i>		
miRNA	ρ	p
miR-16	-0,071	0,555
let-7d	-0,046	0,700
miR-516-5p	-0,023	0,845
miR-517*	0,032	0,791
miR-518b	-0,025	0,834
miR-520a*	0,092	0,441
miR-520h	0,016	0,893
miR-525	0,009	0,941
miR-526a	0,156	0,196

Tabulka P11 Porovnání genové exprese extracelulárních mikroRNA u pacientek s fyziologickou a patologickou hodnotou PI v *arteria umbilicalis* – výsledky testu ANOVA

Porovnání genové exprese extracelulárních mikroRNA u pacientek s fyziologickou a patologickou hodnotou PI v <i>arteria umbilicalis</i>					
miRNA	F	df	p	síla testu (%)	95% interval spolehlivosti
miR-16	0,6587	1,69	0,420	12,6	(-0,198 559; 0,470 913)
let-7d	0,0084	1,69	0,927	5,1	(-0,015 088; 0,016 537)
miR-516-5p	0,5074	1,69	0,479	10,8	(-0,000 017; 0,000 008)
miR-517*	0,0015	1,69	0,970	5,0	(-0,000 030; 0,000 031)
miR-518b	1,5794	1,69	0,213	23,6	(-0,000 123; 0,000 028)
miR-520a*	0,1721	1,69	0,680	6,9	(-0,000 034; 0,000 022)
miR-520h	1,5436	1,69	0,218	23,2	(-0,000 052; 0,000 012)
miR-525	0,0082	1,69	0,928	5,1	(-0,000 086; 0,000 078)
miR-526a	0,1348	1,69	0,715	6,5	(-0,000 084; 0,000 058)

Tabulka P12 Vztah mezi genovou expresí extracelulárních miRNA a pulzatilním indexem v *arteria umbilicalis* – výsledky Spearmanova korelačního koeficientu

Vztah mezi genovou expresí extracelulárních miRNA a pulzatilním indexem v <i>arteria umbilicalis</i>		
miRNA	ρ	p
miR-16	-0,093	0,435
let-7d	-0,041	0,731
miR-516-5p	-0,040	0,736
miR-517*	0,073	0,542
miR-518b	-0,019	0,872
miR-520a*	0,085	0,477
miR-520h	0,038	0,748
miR-525	-0,028	0,812
miR-526a	0,131	0,277

Tabulka P13 Porovnání koncentrace extracelulárních mikroRNA u pacientek s fyziologickou a patologickou hodnotou PI v *arteria cerebri media* – výsledky testu ANOVA

Porovnání koncentrace extracelulárních mikroRNA u pacientek s fyziologickou a patologickou hodnotou PI v <i>arteria cerebri media</i>					
miRNA	F	df	p	síla testu (%)	95% interval spolehlivosti
miR-16	1,0315	1,49	0,315	16,9	(-349 687; 1 064 331)
let-7d	0,0003	1,49	0,986	5,0	(-22 161,9; 22 550,28)
miR-516-5p	0,5479	1,49	0,463	11,2	(-649,334; 299,742 8)
miR-517*	0,1688	1,49	0,683	6,9	(-82,504 5; 54,497 07)
miR-518b	0,0056	1,49	0,941	5,1	(-146,022; 157,283)
miR-520a*	0,0417	1,49	0,839	5,5	(-92,506 8; 75,439 20)
miR-520h	0,0015	1,49	0,970	5,0	(-78,071 4; 75,147 99)
miR-525	0,4311	1,49	0,515	9,9	(-259,679; 131,775 8)
miR-526a	0,6362	1,49	0,429	12,3	(-112,719; 261,083 5)

Tabulka P14 Vztah mezi koncentrací extracelulárních miRNA a pulzatilním indexem v *arteria cerebri media* – výsledky Spearmanova korelačního koeficientu

Vztah mezi koncentrací extracelulárních miRNA a pulzatilním indexem v <i>arteria cerebri media</i>		
miRNA	ρ	p
miR-16	-0,238	0,092
let-7d	-0,318	0,032
miR-516-5p	-0,393	0,005
miR-517*	-0,328	0,020
miR-518b	-0,152	0,269
miR-520a*	-0,314	0,027
miR-520h	-0,238	0,093
miR-525	-0,358	0,011
miR-526a	-0,304	0,032

Tabulka P15 Porovnání genové exprese extracelulárních mikroRNA u pacientek s fyziologickou a patologickou hodnotou PI v *arteria cerebri media* – výsledky testu ANOVA

Porovnání genové exprese extracelulárních mikroRNA u pacientek s fyziologickou a patologickou hodnotou PI v <i>arteria cerebri media</i>					
miRNA	F	df	p	síla testu (%)	95% interval spolehlivosti
miR-16	1,4327	1,49	0,237	21,7	(-0,182 328; 0,719 462)
let-7d	1,4171	1,49	0,240	21,5	(-0,007 999; 0,031 248)
miR-516-5p	0,3150	1,49	0,577	8,5	(-0,000 017; 0,000 009)
miR-517*	0,0059	1,49	0,939	5,1	(-0,000 026; 0,000 024)
miR-518b	0,4716	1,49	0,496	10,3	(-0,000 041; 0,000 084)
miR-520a*	0,0119	1,49	0,914	5,1	(-0,000 030; 0,000 027)
miR-520h	0,3448	1,49	0,560	8,9	(-0,000 022; 0,000 040)
miR-525	0,0004	1,49	0,985	5,0	(-0,000 076; 0,000 074)
miR-526a	0,0022	1,49	0,963	5,0	(-0,000 077; 0,000 081)

Tabulka P16 Vztah mezi genovou expresí extracelulárních miRNA a pulzatilním indexem v *arteria cerebri media* – výsledky Spearmanova korelačního koeficientu

Vztah mezi genovou expresí extracelulárních miRNA a pulzatilním indexem v <i>arteria cerebri media</i>		
miRNA	ρ	p
miR-16	-0,197	0,163
let-7d	-0,237	0,093
miR-516-5p	-0,307	0,030
miR-517*	-0,288	0,041
miR-518b	-0,220	0,120
miR-520a*	-0,339	0,017
miR-520h	-0,256	0,071
miR-525	-0,357	0,012
miR-526a	-0,286	0,043

Tabulka P17 Porovnání koncentrace extracelulárních mikroRNA u pacientek s fyziologickou a patologickou hodnotou cerebroplacentárního indexu – výsledky testu ANOVA

Porovnání koncentrace extracelulárních mikroRNA u pacientek s fyziologickou a patologickou hodnotou cerebroplacentárního indexu					
miRNA	F	df	p	síla testu (%)	95% interval spolehlivosti
miR-16	0,6824	1,48	0,413	12,8	(-425 159; 1 018 167)
let-7d	0,0871	1,48	0,769	6,0	(-26 021,8; 19 361,19)
miR-516-5p	0,1983	1,48	0,658	7,2	(-590,326; 376,263 7)
miR-517*	0,0862	1,48	0,770	6,0	(-79,743 9; 59,426 64)
miR-518b	0,0403	1,48	0,842	5,4	(-169,670; 138,861 2)
miR-520a*	0,0201	1,48	0,888	5,2	(-91,504 5; 79,452 76)
miR-520h	0,0535	1,48	0,818	5,6	(-86,896 7; 68,963 06)
miR-525	1,1399	1,48	0,272	18,1	(-301,311; 92,658 01)
miR-526a	0,0873	1,48	0,769	6,0	(-163,081; 219,269 6)

Tabulka P18 Vztah mezi koncentrací extracelulárních miRNA a cerebroplacentárním indexem – výsledky Spearmanova korelačního koeficientu

Vztah mezi koncentrací extracelulárních miRNA a cerebroplacentárním indexem		
miRNA	ρ	p
miR-16	-0,240	0,092
let-7d	-0,226	0,114
miR-516-5p	-0,219	0,125
miR-517*	-0,215	0,131
miR-518b	-0,074	0,606
miR-520a*	-0,261	0,067
miR-520h	-0,177	0,214
miR-525	-0,190	0,183
miR-526a	-0,340	0,017

Tabulka P19 Porovnání genové exprese extracelulárních mikroRNA u pacientek s fyziologickou a patologickou hodnotou cerebroplacentárního indexu – výsledky testu ANOVA

Porovnání genové exprese extracelulárních mikroRNA u pacientek s fyziologickou a patologickou hodnotou cerebroplacentárního indexu					
miRNA	F	df	p	síla testu (%)	95% interval spolehlivosti
miR-16	1,2748	1,48	0,264	19,8	(-0,201 399; 0,717 295)
let-7d	0,7200	1,48	0,400	13,2	(-0,011 607; 0,028 557)
miR-516-5p	0,0011	1,48	0,974	5,0	(-0,000 014; 0,000 013)
miR-517*	0,7023	1,48	0,406	13,0	(-0,000 015; 0,000 036)
miR-518b	0,2315	1,48	0,633	7,6	(-0,000 049; 0,000 080)
miR-520a*	0,1163	1,48	0,735	6,3	(-0,000 024; 0,000 034)
miR-520h	0,3159	1,48	0,577	8,5	(-0,000 022; 0,000 040)
miR-525	0,0000	1,48	0,998	5,0	(-0,000 076; 0,000 076)
miR-526a	0,2603	1,48	0,612	7,9	(-0,000 100; 0,000 060)

Tabulka P20 Vztah mezi koncentrací extracelulárních miRNA a cerebroplacentárním indexem – výsledky Spearmanova korelačního koeficientu

Vztah mezi genovou expresí extracelulárních miRNA a cerebroplacentárním indexem		
miRNA	ρ	p
miR-16	-0,186	0,191
let-7d	-0,212	0,138
miR-516-5p	-0,190	0,182
miR-517*	-0,269	0,060
miR-518b	-0,167	0,242
miR-520a*	-0,339	0,018
miR-520h	-0,219	0,126
miR-525	-0,185	0,194
miR-526a	-0,329	0,021